

Molekulare Funktion des spannungsgesteuerten
Natriumkanals hNa_v1.9

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von René Oliver Goral

geboren am 21.06.1986 in Leipzig

Für meine Familie.

Dissertation eingereicht: 22.07.2014

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan H. Heinemann (Jena)
2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Zimmer (Jena)
3. Gutachter: Prof. Dr. Peter W. Reeh (Erlangen)

Datum der Verteidigung: 16.01.2015

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | IV |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Spannungsgesteuerte Natriumkanäle | 1 |
| 1.1.1 Genfamilie spannungsgesteuerter Natriumkanäle | 1 |
| 1.1.2 Struktur und Funktion von Na _V -Kanälen | 2 |
| 1.1.3 Der spannungsgesteuerte Natriumkanal Na _V 1.9 | 4 |
| 1.1.4 Na _V -Channelopathien | 6 |
| 1.1.5 Neurotoxine wirken auf Na _V -Kanäle | 7 |
| 1.2 Nozizeption | 9 |
| 1.2.1 Weiterleitung von Schmerzsignalen | 9 |
| 1.2.2 Neuronen aus Hinterwurzelganglien | 11 |
| 1.3 Zielstellung der Arbeit | 12 |
| 2 Material und Methoden | 14 |
| 2.1 Chemikalien | 14 |
| 2.2 Molekularbiologie | 15 |
| 2.2.1 Gene, Expressionsplasmide, Mutanten | 15 |
| 2.2.2 Konstruktion von Kanalchimären | 15 |
| 2.2.3 Mutagenese des IFM-Linkers | 18 |
| 2.2.4 Mutationen in Neurotoxin-Rezeptorstelle 1 | 18 |
| 2.2.5 RNA-Synthese | 19 |
| 2.3 Elektrophysiologie | 19 |
| 2.3.1 Oozytenpräparation und mRNA-Injektion | 19 |
| 2.3.2 Zweielektroden-Spannungsklemme | 21 |
| 2.3.3 Zellkulturarbeiten | 22 |
| 2.3.4 Patch-Clamp | 23 |
| 2.4 Datenanalyse | 26 |
| 2.4.1 Pulsprotokolle | 26 |
| 2.4.2 Bestimmung der Inaktivierungszeitkonstante τ_h | 31 |
| 2.4.3 Korrektur des Diffusionspotentials | 31 |
| 2.4.4 Software | 32 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 2.4.5 | Elektronische Messwertverarbeitung und Statistik | 32 |
| 3 | Ergebnisse | 34 |
| 3.1 | Oozytenexperimente | 34 |
| 3.1.1 | Funktionelle Expression von Wildtypkanälen | 34 |
| 3.1.2 | Expression von Domänen aus hNa _V 1.9 in rNa _V 1.4 | 36 |
| 3.1.3 | hNa _V β1 vergrößert Stromamplitude von 9999_C4 | 41 |
| 3.1.4 | Untersuchung der schnellen Inaktivierung | 42 |
| 3.1.5 | Nachweis der Expression durch Modifikation der Stromantwort . . . | 47 |
| 3.1.6 | IQM-Motiv bewirkt Inaktivierungsdefizienz von 9999_C4 und 4444 | 53 |
| 3.2 | Toxinexperimente | 56 |
| 3.2.1 | Serin 360 vermittelt TTX- und STX-Resistenz von hNa _V 1.9 | 56 |
| 3.2.2 | hNa _V 1.9 ist μSIIIA-resistent | 60 |
| 3.3 | Patch-Clamp-Experimente | 61 |
| 3.3.1 | Funktionelle Expression von hNa _V 1.9 in ND7/23-Zellen | 61 |
| 3.3.2 | C-Terminus von hNa _V 1.9 beeinflusst Gleichgewichts-Inaktivierung . | 64 |
| 3.3.3 | Die hNa _V 1.9-Inaktivierung ist IFM-vermittelt | 67 |
| 3.3.4 | Deaktivierung von Na _V -Kanälen | 73 |
| 3.3.5 | TEVC- und Patch-Clamp-Resultate unterscheiden sich aufgrund der F ⁻ -Sensitivität von hNa _V 1.9 | 75 |
| 3.4 | Einfluss von hNa _V 1.9 auf das Schmerzempfinden | 78 |
| 3.4.1 | Die Mutation L811P untersucht in <i>Xenopus</i> -Oozyten | 78 |
| 3.4.2 | Die hNa _V 1.9-Mutante L811P untersucht in ND7/23-Zellen | 80 |
| 4 | Diskussion | 86 |
| 4.1 | Keine funktionelle hNa _V 1.9-Expression in <i>Xenopus</i> -Oozyten | 86 |
| 4.2 | C-Terminus reguliert funktionelle Expression von hNa _V 1.9 | 88 |
| 4.3 | C-Terminus reguliert Gleichgewichts-Inaktivierung von hNa _V 1.9 | 90 |
| 4.4 | 9999_C4 als Hilfsmittel zur Untersuchung der hNa _V 1.9-Funktion | 91 |
| 4.5 | Serin 360 vermittelt TTX- und STX-Resistenz von hNa _V 1.9 | 93 |
| 4.6 | Die Kanalinaktivierung von hNa _V 1.9 ist IFM-vermittelt | 93 |
| 4.7 | Analgesie ausgelöst durch überaktive hNa _V 1.9-Kanäle | 95 |
| 5 | Zusammenfassung & Summary | 98 |
| 5.1 | Zusammenfassung | 98 |
| 5.2 | Summary | 99 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 101 |
| 7 | Anhang | 114 |

| | | |
|----------|----------------------------------|------------|
| 8 | Selbständigkeitserklärung | 126 |
|----------|----------------------------------|------------|

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------------|--|
| BSA | – Rinderserumalbumin |
| Ca ²⁺ /CaM | – Ca ²⁺ -gesättigtes Calmodulin |
| Ca _V -Kanal | – spannungsgesteuerter Calciumkanal |
| DI/II/III/IV | – Domäne 1, Domäne 2, Domäne 3, Domäne 4 |
| DEPC | – Diethyldicarbonat |
| DRG-Neuron | – Neuronen aus Hinterwurzelganglien |
| EDTA | – Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | – Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| ER | – Endoplasmatisches Retikulum |
| FCS | – fetales Kälberserum |
| GTP-γ-S | – Guanosin-5'-(γ-thio)triphosphat |
| HEPES | – 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| hERG | – human <i>ether-à-gogo</i> -related gene (KCNH2) |
| HGNC | – HUGO Gene Nomenclature Committee |
| IFC | – Mutation von Met 1304 bzw. 1324 zu Cys im IFM-Motiv für oxidativ bedingten Inaktivierungsverlust |
| IQM | – Mutation von Met 1304 bzw. 1324 zu Gln im IFM-Motiv für inaktivierungsdefizienten Kanal |
| K _V -Kanal | – spannungsgesteuerter Kaliumkanal |
| Na _V -Kanal | – spannungsgesteuerter Natriumkanal |
| PBS | – Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PCR | – Polymerase-Kettenreaktion |
| PGE2 | – Prostaglandin E2 |
| PKC | – Proteinkinase C |
| PNS | – peripheres Nervensystem |
| S1-6 | – Transmembransegmente 1-6 |
| SY | – Mutation von Ser 360 zu Tyr im DI S5-S6-Linker für TTX-Sensitivität des Kanals |
| TEVC | – Zweielektroden-Spannungsklemme |
| TRIS/HCl | – Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid |
| TrkB | – Tropomyosin-verwandte Kinase B |
| YS | – Mutation von Tyr 401 zu Ser im DI S5-S6-Linker für TTX-Resistenz des Kanals |
| ZNS | – zentrales Nervensystem |

1 Einleitung

1.1 Spannungsgesteuerte Natriumkanäle

1.1.1 Genfamilie spannungsgesteuerter Natriumkanäle

Die Genfamilie der spannungsgesteuerten Natriumkanäle (Na_V -Kanäle) umfasst zehn Mitglieder: SCN1A bis SCN11A. Diese codieren die Kanäle $\text{Na}_V1.1$ bis $\text{Na}_V1.9$ sowie den atypischen Na_X -Kanal (Abb. 1.1). Zwischen den einzelnen Vertretern herrscht eine starke Proteinsequenz-Homologie von über 50% bis 90% [134], daher wird die Entstehung der unterschiedlichen Gene auf Genduplikationen zurückgeführt [42].

Die meisten Na_V -Gene sind auf den Chromosomen 2q21-24 (SCN1A, SCN2A, SCN3A, SCN7A, SCN9A) und 3p21-24 (SCN5A, SCN10A, SCN11A) konzentriert [94]. Lediglich die Gene SCN4A (17q23-25) und SCN8A (12p13) liegen separat vor [94]. Über diese genetische Abgrenzung hinaus lassen sich Na_V -Kanäle auch anhand ihrer toxikologischen Eigenschaften hinsichtlich des Neurotoxins Tetrodotoxin (TTX) in resistente und sensitive Kanäle unterscheiden (Abb. 1.1). Als TTX-sensitiv werden Na_V -Kanäle bezeichnet, die durch nanomolare TTX-Konzentrationen vollständig inhibiert werden können, während die resistenten Kanäle erst durch mikromolare TTX-Konzentrationen blockiert werden. Alle Kanalgene auf den Loci 3p21-24, 17q23-25 und 12p13 codieren Proteine mit einer mindestens 50-fach kleineren Sensitivität für TTX als die anderen Kanalgene auf 3p21-24.

Viele Na_V -Kanäle weisen klare Gewebsspezifitäten auf. So kommen die Kanäle $\text{Na}_V1.2$ und $\text{Na}_V1.3$ (nach Axotomie auch im PNS) im ZNS vor, während $\text{Na}_V1.5$ im Herz und $\text{Na}_V1.4$ in Skelettmuskeln nachgewiesen wurden. Die Kanäle $\text{Na}_V1.1$ und $\text{Na}_V1.6$ werden sowohl im ZNS als auch im PNS exprimiert. Eine relativ weite Verbreitung im PNS hat der $\text{Na}_V1.7$ -Kanal, während $\text{Na}_V1.8$ in Sensorneuronen und im Herz exprimiert wird [130]. Der Kanal $\text{Na}_V1.9$ wurde außer in DRG-Neuronen und Trigemininalganglien auch in enterischen Neuronen [68] sowie in Motorneuronen nachgewiesen [69, 82].

Als schmerzrelevant werden die Kanäle $\text{Na}_V1.3$, $\text{Na}_V1.7$, $\text{Na}_V1.8$ und $\text{Na}_V1.9$ angesehen. In nozizeptiven Sensorneuronen im dorsalen Horn der Wirbelsäule (DRG-Neuronen) werden mit Ausnahme der Kanäle $\text{Na}_V1.4$ und $\text{Na}_V1.5$ zumindest geringe Mengen aller anderen Na_V -Kanäle exprimiert (Abb. 1.1 [137]).

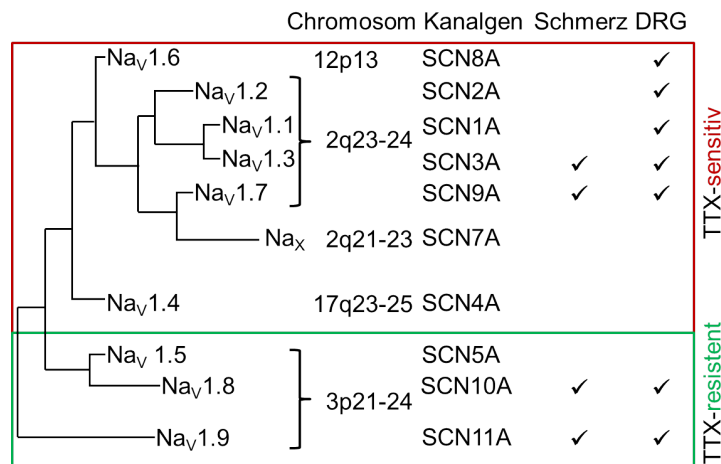


Abbildung 1.1: Die Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Familie der Na_V -Kanäle. Die Genfamilie umfasst die Gene SCN1A bis SCN11A. Sie sind als Cluster auf den Chromosomen 2q21-24 (SCN1A, SCN2A, SCN3A, SCN7A, SCN9A) und 3p21-24 (SCN5A, SCN10A, SCN11A) sowie als Isoformen auf den Chromosomen 17q23-25 (SCN4A) und 12p13 (SCN8A) lokalisiert. Die verwandtschaftlichen Beziehungen wurden durch bioinformatische Analyse mit Clustal W und PAUP unter der Einbeziehung von Invertebratenkanälen erstellt (nicht gezeigt). Na_V -Kanäle lassen sich hinsichtlich ihrer Sensitivität für das Neurotoxin in sensitive (rot) und resistente (grün), ihrer Relevanz für die Übertragung von Schmerzsignalen sowie der Expression in DRG-Neuronen unterteilen. Die Abbildung wurde modifiziert nach Yu 2003 und Chahine 2005 [134, 137].

1.1.2 Struktur und Funktion von Na_V -Kanälen

Die Na_V -Kanäle sind große Membranproteine, die aus einer porenbildenden ca. 260 kDa α -Untereinheit und 30-40 kDa β -Untereinheiten bestehen, welche nichtkovalent (SCN1B und SCN3B) oder kovalent (SCN2B und SCN4B) gebunden sind. Für die Ionenpermeation ist die α -Untereinheit ausreichend, aber die β -Untereinheiten modifizieren das Kanalschaltverhalten [67].

Die α -Untereinheit bildet 24 membrandurchspannende α -Helices aus (Abb. 1.2A), von denen sechs Helices eine der vier Domänen formen [129]. Die ersten vier Helices (S1-S4) bilden die Spannungssensordomäne, wobei S4 durch Anwesenheit positiv geladener Aminosäuren auf Änderungen der Membranspannung durch Bewegung im elektrischen Feld reagieren kann. Die Helices S5, S6 sowie die S5-S6-Porenschleifen bilden die Porenregion, wobei letztere die Pore auskleiden und mit den drei anderen Schleifen das Selektivitätsfiltermotiv Aspartat, Glutamat, Lysin, Alanin (DEKA) formen [89]. Durch dieses Aminosäurequartett werden hochselektiv bis auf ein H_2O -Molekül dehydratisierte Na^+ -Ionen geleitet.

Eine ungefähre Vorstellung der räumlichen Struktur eines Na_V -Kanals erhält man durch Röntgenkristallstrukturen des entfernt verwandten Na_VAb mit Sicht von extra- (Abb. 1.2B) bzw. intrazellulärer Seite (Abb. 1.2C, [131]). In Abb. 1.2D sind außerdem noch die einzelnen Helices S1-S6 schematisch an die Kristallstruktur angepasst. Es zeigt sich, dass die Segmente S1-S4 und S5-S6 jeweils räumliche Einheiten bilden. Bei Na_VAb handelt es sich jedoch um einen tetrameren, bakteriellen Na_V -Kanal. Jedes Monomer bildet, wie bei K_V -Kanälen, eine Domäne. Es ist die einzige vollständig aufgeklärte Na_V -Kanalstruktur. Das Protein Na_VAb ist in vielen Bereichen stark homolog zu anderen Na_V -Kanälen.

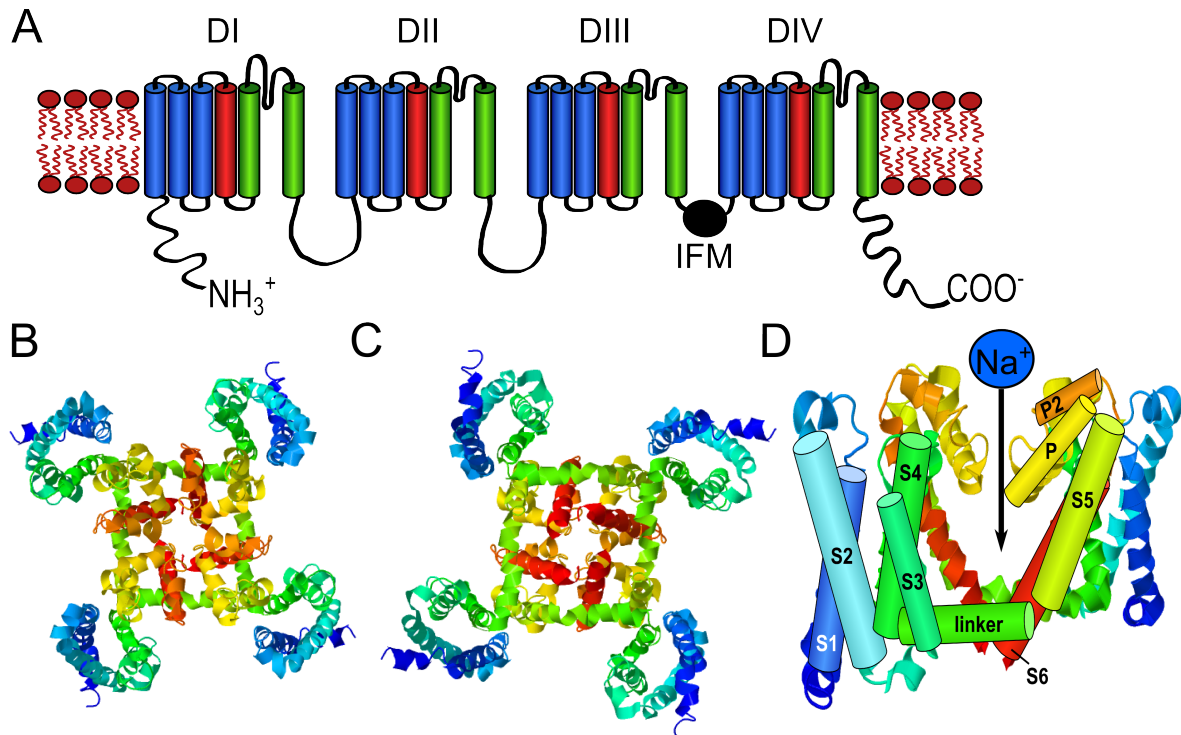


Abbildung 1.2: Na_V -Kanäle sind große Membranproteine für die Permeation von Na^+ -Ionen. **A** Schematische Darstellung eines Na_V -Kanals bestehend aus 24 Transmembranhelices, die sich in 4 homologe Domänen gliedern. Die Segmente S1-S4 (blau bzw. rot) bilden die Spannungssensor-Domäne. Die Pore wird durch Segmente S5-S6 (grün) geformt. Lange intrazelluläre Schleifen verbinden die einzelnen Domänen miteinander. Der N- sowie C-Terminus bilden eigenständige Domänen, welche in das Zytoplasma reichen. Die Aminosäuren Isoleucin, Phenylalanin und Methionin (IFM-Motiv) dienen als Inaktivierungspartikel. **B-C** Kristallstruktur des tetrameren, bakteriellen Natriumkanals Na_VAb betrachtet von extra- (B) und intrazellulärer (C) Seite aus (PDB-Code: 4EKW, [131]). **D** Zur Verdeutlichung der Helixanordnung wurden Zylinder für die einzelnen Segmente S1-S6 sowie die Porenhelices P und P2 abgebildet. Zwei Domänen sind für die Übersichtlichkeit ausgeblendet.

Auf Membrandepolarisationen reagieren die Spannungssensoren mit einer auswärts gerichteten Bewegung [35], welche zu einer Konformationsänderung führt und die Kanalpore

öffnet (Abb. 1.3A). Das führt zu einem Na^+ -Einstrom, welcher sich durch einen elektrischen Stromfluss äußert. Bereits nach etwa 1 ms wird der Stromfluss durch den Verschluss der Pore durch die Inaktivierungsschleife mithilfe des IFM-Motivs inhibiert. Dieser Vorgang ist über DIV direkt an die Kanalaktivierung gekoppelt [127]. Die Spannungssensoren bewegen sich erst nach Repolarisation der Zellmembran zurück auf ihre Ausgangsposition. Die schnelle Kanalöffnung und -inaktivierung der Na_V -Kanäle spielt eine essentielle Rolle für die Erzeugung von Aktionspotentialen, wo sie den schnellen Aufstrich in Reaktion auf den Reiz bewirken.

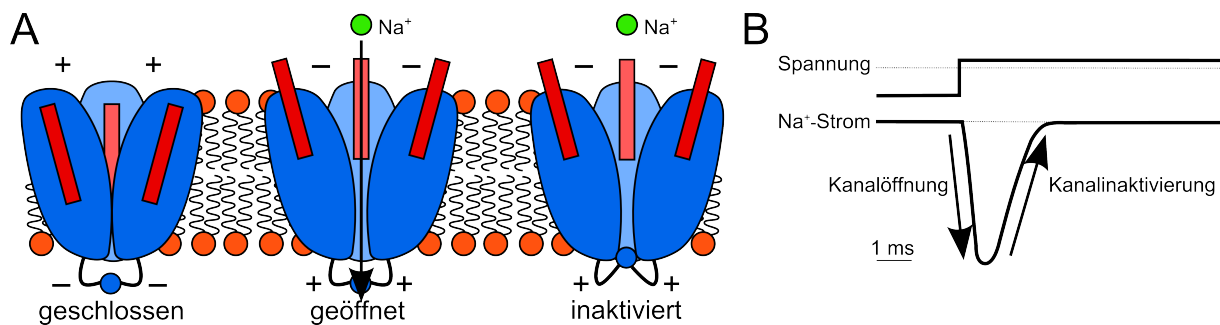


Abbildung 1.3: Die Konformationen des Na_V -Kanals. **A** Im Ruhezustand ist die Pore geschlossen und impermeabel für Na^+ -Ionen. In Reaktion auf Membrandepolarisation bewegen sich die Spannungssensoren (rot) nach außen und öffnen die Kanalpore. Innerhalb von 1 ms verschließt das Inaktivierungspartikel die Pore und inaktiviert den Stromfluss. Kanäle im inaktivierten Zustand können nicht aktiviert werden. Nach Repolarisation der Membran gehen die Kanäle wieder in den geschlossenen Zustand über. **B** Die Stromantwort von Na_V -Kanälen hervorgerufen durch Membrandepolarisation erreicht den maximalen Na^+ -Einstrom in ca. 1 ms. Die Stromabnahme vollzieht sich aufgrund der schnellen Inaktivierung. Die Abbildung wurde modifiziert nach [78].

1.1.3 Der spannungsgesteuerte Natriumkanal $\text{Na}_V1.9$

Der Natriumkanal $\text{Na}_V1.9$ wurde zuerst in DRG-Neuronen von Ratten nachgewiesen [98]. Er zeichnet sich durch viele Unterschiede zu seinen Verwandten aus. So ist das humane Protein mit 1791 Aminosäuren deutlich kürzer als $\text{Na}_V1.1$ - $\text{Na}_V1.8$, welche 1900 - 2000 Aminosäuren umfassen. Außerdem ist die Aminosäuresequenz nur etwa 50-60% homolog (je nach Publikation und Organismus) zu den anderen Na_V -Kanälen [98, 134].

Zu Beginn des Projektes im Jahr 2010 waren bereits viele Unterschiede von $\text{Na}_V1.9$ zu anderen Kanälen bekannt. So zeichnet sich der Kanal durch Offenzustände bei Ruhemembranpotential mit einzigartiger, besonders langsamer Aktivierungs-, Inaktivierungskinetik und großer persistierender Stromkomponente aus (Abb. 1.4B-C [97]). Es konnte gezeigt werden, dass auch der humane Kanal eine vergleichbare Kinetik besitzt [71]. Da $\text{Na}_V1.9$ aufgrund der langsamen Kinetik nicht dazu in der Lage ist, Aktionspotentiale auszulösen,

wurde die Vermutung aufgestellt, dass er für die Regulation des Ruhemembranpotentials verantwortlich ist [96].

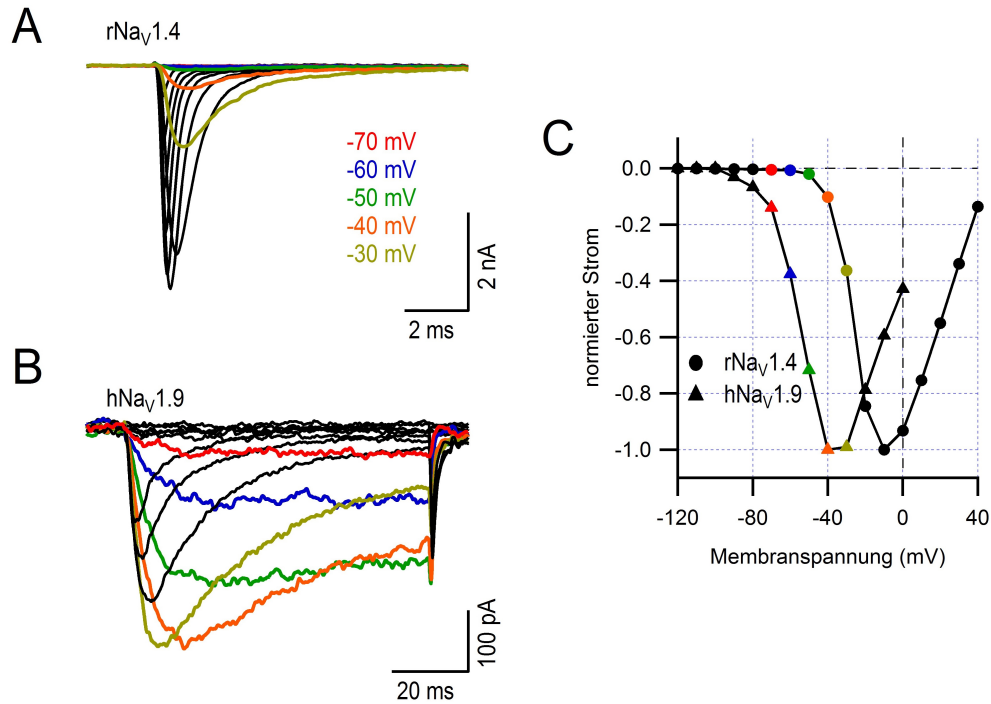


Abbildung 1.4: Der Kanal Nav1.9 zeichnet sich durch langsame Kinetik aus. **A** Typische Stromantworten von Nav -Kanälen (am Beispiel von rNav1.4) nach Membrandepolarisation abgeleitet mithilfe der Patch-Clamp-Methode in Ganzzellkonfiguration von ND7/23-Zellen. **B** Stromantworten von hNav1.9 in ND7/23-Zellen. Typische nichtinaktivierende Na^+ -Ströme bei Ruhemembranpotential. Die Kanäle zeigen in DRG-Neuronen vergleichbare Kinetik. **C** Normierte Stromextrema von hNav1.9 und rNav1.4 aufgetragen über der Membranspannung.

Es wurde umfangreich dokumentiert, dass z. B. PGE2 [10, 80, 107], der Neurokinin-Rezeptor 3 [76] oder GTP- γ -S [52, 71] den Kanal stark durch Proteinkinase C-vermittelte Phosphorylierung stimulieren können und die Nav1.9 -Aktivität verstärken. Das kann als Ursache dafür angesehen werden, dass die Nav1.9 -Aktivität unter neuropathischen oder Entzündungszuständen wie Colitis deutlich erhöht ist [121]. So führen die Verletzung des Ischias-Nervs [50] oder durch normale bzw. durch Darminfektionen bedingte Entzündungen [86] zu Nav1.9 -bedingter Hypererregbarkeit. Für diese Sensibilisierung ist Nav1.9 hauptverantwortlich [17]. Es sind kausale Zusammenhänge zwischen Nav1.9 und der Hyperalgesie bei Diabetes bekannt [41]. Über den Interferon γ -Rezeptor wurden zudem Beziehungen von Nav1.9 zum Immunsystem hergestellt [57].

Es wurde auch bereits gezeigt, dass Nav1.9 -Ströme in DRG-Neuronen durch Neurotrophine [95, 101] oder durch direkte Interaktion mit Neurotrophin-Rezeptoren [1] reguliert werden. Nav1.9 wird auch durch Proteininteraktionen mit dem cytosolischen Protein

FHF1B [106] und dem Verbindungspartner zum Cytoskelett Contactin reguliert [105].

Dabei scheinen sich die $\text{Na}_V1.9$ -Eigenschaften auch in Abhängigkeit von der Entwicklungsphase des Organismus [18], alternatives Spleißen [51] oder der Glykosylierung [108] zu verändern. Andererseits führt ein *knock-out* von $\text{Na}_V1.9$ in Mäusen nur zu geringen Veränderungen des Schmerzempfindens [135].

Neben seiner Bedeutung für Nozizeption scheint $\text{Na}_V1.9$ allerdings auch eine wichtige Rolle in enterischen Neuronen [68] zu erfüllen. Erst 2013 konnte gezeigt werden, dass $\text{Na}_V1.9$ die Darmmotilität reguliert [12]. Zudem ist $\text{Na}_V1.9$ für das Axonwachstum in Motorneuronen verantwortlich [69, 82]. Es gibt auch einen kausalen Zusammenhang von Hyperhidrosis und Analgesie [38]. Es wurde gezeigt, dass $\text{Na}_V1.9$ im *Nucleus supraopticus* vorkommt, welcher eine Schnittstelle zwischen Nervensystem und endokrinem System im Hypothalamus bildet [93]. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass die physiologische Rolle von $\text{Na}_V1.9$ aufgrund der eher ubiquitären Expression abundant und weniger auf Schmerz fokussiert ist, als das beispielsweise bei $\text{Na}_V1.8$ der Fall ist.

In den meisten Experimenten wurden bisher nativ vorkommende $\text{Na}_V1.9$ -Kanäle untersucht. Einerseits ist es gut, die Kanaleigenschaften in einer physiologischen Umgebung zu untersuchen, andererseits führte bisher nur die Mikroinjektion von DNA in Maus-DRG-Neuronen zu messbaren $\text{hNa}_V1.9$ -Strömen [71]. Erst 2013 wurde gezeigt, dass $\text{hNa}_V1.9$ in ND7/23-Zellen exprimiert werden kann [8].

Obwohl die funktionelle Expression von $\text{Na}_V1.9$ -Kanälen in DRG-Neuronen sehr hoch ist, überlagern sich dort die Stromsignale von zahlreichen Ionenkanälen. Das erschwert die Untersuchung isolierter $\text{Na}_V1.9$ -Ströme.

1.1.4 Na_V -Channelopathien

Da Na_V -Kanäle fein regulierte Proteine mit einer zentralen Rolle für die Erregungsweiterleitung in vielen unterschiedlichen Geweben sind, bewirken durch Genmutationen oder Regulation bedingte Proteinveränderungen oft schwerwiegende Erkrankungen in Muskeln oder Nerven. Diese werden als Channelopathien bezeichnet. Dabei ist zu unterscheiden, ob die Mutation eine Verstärkung der Kanalaktivität durch Verlangsamung der Inaktivierung oder eine Verschiebung der Kanalöffnung in den Bereich des Ruhepotentials (*gain of function*) oder eine Verringerung der Kanalaktivität (*loss of function*) bewirkt. Je nach betroffenem Kanal sind die Symptome entsprechend unterschiedlich.

Im Jahr 2010 waren bereits umfangreiche Kenntnisse über viele Erkrankungen aufgrund von Na_V -Störungen bekannt - außer über $\text{Na}_V1.9$ [20]. So lösen gestörte $\text{Na}_V1.1$ -Kanäle verschiedene Formen von Epilepsie aus. Für $\text{Na}_V1.2$ ist bekannt, dass Fehlfunktionen benigne familiäre neonatal-infantile Anfälle auslösen. Ein Verlust jeglicher $\text{Na}_V1.2$ -Aktivität kann zu Epilepsie führen [59]. Die gestörte $\text{Na}_V1.6$ -Funktion resultiert in Krankheiten wie cerebraler Ataxie [74] oder motorischer Endplattenkrankheit [73].

Über $\text{Na}_V1.4$ ist bekannt, dass Störungen zu verschiedenen Formen von Paralyse und *Paramyotonia congenita* führen [91]. Channelopathien, die auf $\text{Na}_V1.5$ -Fehlfunktionen zurückgeführt werden, betreffen die Herzfunktion u. a. bei LQT-Syndrom Typ III oder Brugada-Syndrom [83].

Der Kanal $\text{Na}_V1.3$ ist potentiell an peripheren neuropathischen Schmerzen nach Rückenmarksverletzungen beteiligt [102]. Eine erhöhte $\text{Na}_V1.7$ -Aktivität führt zu einer erhöhten Schmerzempfindlichkeit oder extremen Schmerzanfällen, die als primäre Erythromelalgie (PE) oder paroxysmale extreme Schmerzstörung (PEPD) bezeichnet werden [100]. Eine Dysfunktion des $\text{Na}_V1.7$ -Kanals bewirkt z. B. Schmerzunempfindlichkeit (CIPA bzw. Analgesie) und Riechdysfunktion (Anosmie [36]). Störungen des $\text{Na}_V1.8$ -Kanals rufen diverse schmerzhafte Neuropathien hervor [16] und beeinflussen die Herztätigkeit [21, 22]. Der Zusammenhang zwischen $\text{Na}_V1.8$ und Arrhythmien ist nicht aufgeklärt. Nach aktuellem Kenntnisstand wird der durch $\text{Na}_V1.8$ erhöhte späte Na^+ -Strom als mögliche Ursache für diese Störung angesehen [25].

1.1.5 Neurotoxine wirken auf Na_V -Kanäle

Neurotoxine sind chemische Verbindungen und Peptide, welche Auswirkungen auf die Funktion des Nervensystems haben [48]. Sie werden von Tieren und Mikroorganismen sowohl offensiv als auch defensiv eingesetzt. Sie sollen entweder die Beute lähmen, verwirren, kampfunfähig machen oder auf den Angreifer große Schmerzen ausüben. Dabei kann es sich sowohl um Venome (Mischungen verschiedener Proteintoxine) oder Gifte (Sekundärprodukte des Metabolismus zur Verteidigung [19]) handeln. Zum Teil sind Neurotoxine hochspezifisch für bestimmte Rezeptoren wie Ionenkanäle im ZNS oder PNS. Die Interaktion mit dem Rezeptor kann dabei eine Veränderung der Erregbarkeit von exzitatorischen Zellen auslösen, wobei die Toxinwirkungen vollkommen unterschiedlich ausfallen.

Die Toxine von vielen giftigen Tiere beeinflussen die Funktionen von Na_V -Kanälen. Neben Spinnen- und Skorpiontoxinen haben auch Gifte aus Kugelfischen, Kegelschnecken, Dinoflagellaten und Pfeilgiftfröschen Auswirkungen auf die Funktion dieser Kanäle. Zudem sind auch Insektizide aus der Klasse der Pyrethroide wirksame Gifte.

Man unterteilt für Na_V -Kanäle relevante Toxine hinsichtlich der Bindestelle (Neurotoxin-Rezeptorstelle) am Kanal in acht unterschiedliche Gruppen: Neurotoxin-Rezeptorstellen 1-7 und die Lokalanästhetika. Für diese Arbeit wurden lediglich Toxine verwendet, welche ihre Wirkung durch Bindung an die Rezeptorstelle 1 entfalten können. Die Gruppe der Neurotoxine für Rezeptorstelle 1 umfasst die Guanidiniumtoxine Tetrodotoxin (TTX, Abb. 1.5A) und Saxitoxin (STX, Abb. 1.5B) sowie verschiedene Gonyautoxin-Varianten [65]. Sie zählen zu den stärksten bekannten Giften mit neurotoxischer Wirkung. Die Gruppe der μ -Conotoxine sind zahlreiche weitere Vertreter, die an Rezeptorstelle 1 binden.

Tetrodotoxin aus Kugelfischen (Abb. 1.5D) wurde als Blocker der Na^+ -Leitfähigkeit beschrieben [138], welcher von außen die Kanäle verschließt [55]. Es spielte eine große Rolle bei der Entdeckung der Na_V -Kanäle [4]. Saxitoxin ist der einzige marine Naturstoff, der auf der Liste der chemischen Kampfstoffe aufgeführt ist [65]. Zudem gehört es zu der Gruppe von Substanzen, welche für die paralytische Schalentiervergiftung (PSP) verantwortlich gemacht werden. Es wird von einer Reihe Dinoflagellaten der Familie *Alexandrium spp.* und Cyanobakterien wie *Anabaena spp.* synthetisiert.

Die Gruppe der Rezeptorstelle 1-Toxine umfasst typische Porenblocker, die die Kanäle durch Bindung an den Porenschleifen verschließen und dadurch den Na^+ -Strom inhibieren [43]. Dabei scheint der Selektivitätsfilter selbst in die Toxinbindung involviert zu sein [90]. Der Unterschied der Spezifität wird bei den sensitiven Kanälen durch einen aromatischen Rest (Phenylalanin bzw. Tyrosin) und bei den resistenten Kanälen durch ein Cystein oder Serin erreicht. Nichtaromatische Reste erhöhen die EC_{50} der Kanäle von 1 nM auf 60 mM für TTX [20]. Für STX gilt einerseits eine höhere Potenz im Vergleich zu TTX, die Sensitivität wird aber wie bei TTX durch den aromatischen Rest vermittelt. Allerdings gibt es insofern zwei Ausnahmen, dass $\text{Na}_V1.9$ als STX-sensitiv postuliert [1] und $\text{hNa}_V1.7$ als STX-resistent charakterisiert wurden [49]. Diese Beobachtungen waren unerwartet.

Die Familie der μ -Conotoxine gehört zur M-Superfamilie der Cystein-reichen Conopeptide [14]. Da es eine Vielzahl von Kegelschnecken mit ganz individuellen Venomen gibt, ist bisher nicht bekannt, wie viele μ -Conotoxine es insgesamt gibt. Als erstes Toxin aus dieser Familie wurde μGIIIA aus *Conus geographus* entdeckt (Abb. 1.5C), welches in nanomolaren Konzentrationen sehr spezifisch $\text{Na}_V1.4$ -Kanäle blockiert [87]. Dabei scheint Arginin 13 von besonderer Bedeutung für die Toxinbindung zu sein [14]. Außerdem wurde durch [136] gezeigt, dass TTX und μ -Conotoxine gleichzeitig am Kanal gebunden sein können.

Zudem sind die TTX-resistenten $\text{Na}_V1.5$ - und $\text{Na}_V1.8$ -Kanäle für μ -Conotoxine un sensitiv [115]. Für $\text{Na}_V1.5$ vermitteln die Porenschleifen aus DI und DII die Insensitivität gegenüber μ -Conotoxin SIIIA [114]. Das trifft bei $\text{Na}_V1.8$ nicht zu [115]. Ohnehin scheinen alle μ -Conotoxine unterschiedliche Spezifitäten für Kanalisofomen und Spezies zu besitzen.

Zur Toxikologie von $\text{Na}_V1.9$ ist bisher so gut wie nichts bekannt.

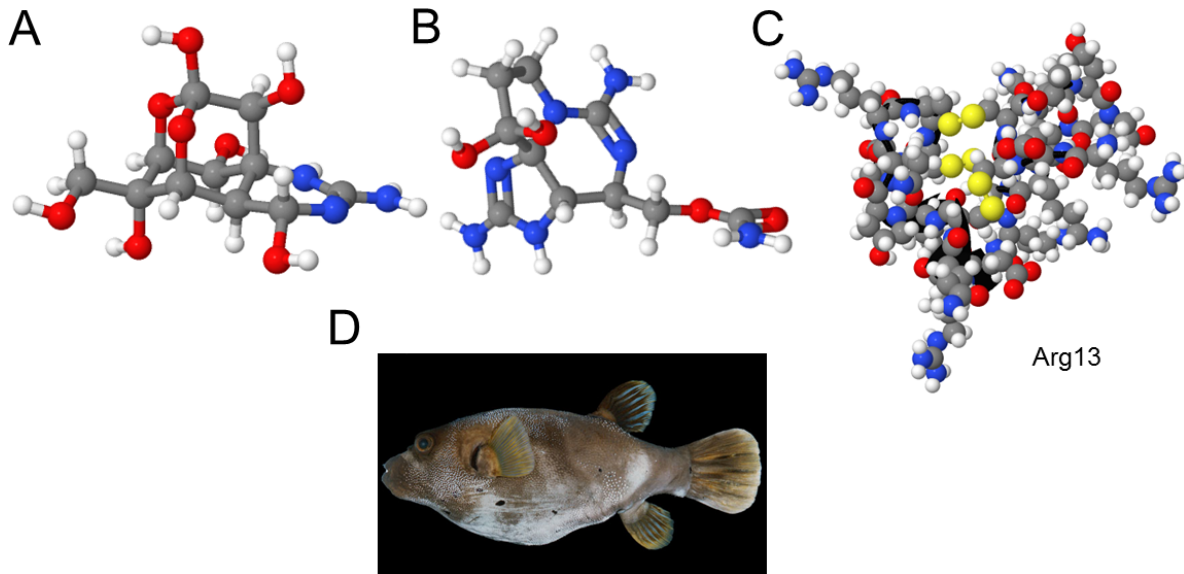


Abbildung 1.5: Toxine aus verschiedenen Spezies wirken auf Na_V -Kanäle. **A-B** Die Guanidiniumtoxine Tetrodotoxin (A) und Saxitoxin (B) blockieren den Natriumstrom durch Interaktion mit der Pore und den Porenschleifen des Kanals. Die *ball-and-stick*-Modelle wurden aus www.chemspider.com entnommen. **C** Das Toxin μGIIIA steht exemplarisch für eine Gruppe von bekannten μ -Conotoxinen. Es blockiert spezifisch $\text{Na}_V1.4$. Als besonders wichtiger Rest für die Toxinbindung wurde Arginin 13 bestimmt. Die 3D-Struktur 1TCG wurde aus www.pdb.org entnommen. **D** Tetrodotoxin wird aus Kugelfischen gewonnen (Bild entnommen aus www.fishbase.org).

1.2 Nozizeption

1.2.1 Weiterleitung von Schmerzsignalen

Die Fähigkeit Schmerzen zu empfinden (Nozizeption) ist eine essentielle Reaktion des Körpers um z. B. vor Gewebeverletzungen zu warnen oder an bestehende Verletzungen zu erinnern.¹ So ist die bedingte Aversion eine erworbene Verhaltensweise bei Tieren, welche das Meiden bestimmter Orte, Situationen oder Handlungsweisen aufgrund schlechter Erfahrungen (z. B. durch Schmerzen) bewirkt.

Um überhaupt Schmerzen empfinden zu können, sind verschiedene spezialisierte Zellen notwendig, die potentielle Schmerzursachen erkennen können, Schmerzsignale aus der Peripherie über das zentrale Nervensystem an das Gehirn weiterleiten, solche Signale im Gehirn verarbeiten und eine Reaktion auf den Schmerzstimulus auslösen. Jedoch ist Schmerz kein rein objektiver Ausdruck eines sensorischen Geschehens, es handelt sich

¹Dieser Abschnitt ist eine Zusammenfassung mehrerer Kapitel aus Kandel 2013 [3].

eher um ein Ergebnis der Prozessierung vielfältiger Signale im Gehirn. Schmerzen sind in vielerlei Hinsicht auch subjektive Empfindungen, welche sich situationsabhängig oder krankheitsbedingt verändern können. Dabei können Schmerzen akut, persistent und chronisch auftreten.

In Abb. 1.6 ist der Mechanismus der Schmerzperzeption für einen noxischen Stimulus (Stich mit einer Nadel) skizziert. Im peripheren Gewebe (z. B. Haut) gibt es spezialisierte Zellen, welche auf mechanische oder thermische Schmerzreize (Hitze und Kälte) reagieren können und diese Signale über die A δ -Fasern (schnell) oder C-Fasern (langsam) von nozizeptiven DRG-Neuronen über das dorsale Horn zum Rückenmark weiterleiten. Im Rückenmark findet eine Weiterleitung zum somatosensorischen Cortex im Gehirn statt. Dabei ist die schmerzende Körperregion je nach betroffenem Körperteil zum Teil punktgenau definierbar, weil für die Schmerzverarbeitung aus unterschiedlichen Extremitäten verschiedene Regionen im somatosensorischen Cortex verantwortlich sind.

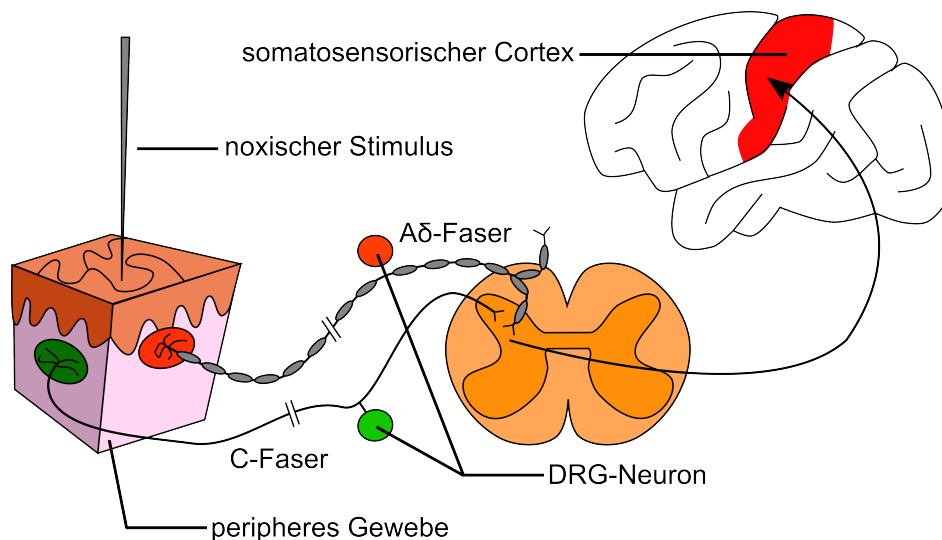


Abbildung 1.6: Die DRG-Neuronen übertragen Schmerzstimuli aus dem peripheren Gewebe zum Rückenmark. Noxische Stimuli (Stich einer Nadel) können von nozizeptiven Rezeptoren (z. B. in der Haut) detektiert werden. Die Weiterleitung des Signals findet über A δ -Fasern statt. Bei Gewebsverletzung werden zusätzlich noch C-Fasern zur Übermittlung verwendet. Die Signale werden über die Axone der DRG-Neuronen in das dorsale Horn geleitet. Dort führen lokale Äste (Reflexkreisläufe) wieder aus dem Rückenmark und aufsteigende Äste zum Gehirn. Die Verarbeitung der Schmerzsignale findet im somatosensorischen Cortex des Gehirns statt. Die Abbildung ist modifiziert nach Kandel 2013 [3].

1.2.2 Neuronen aus Hinterwurzelganglien

Spezialisierte, afferente Sensorneuronen im dorsalen Horn der Wirbelsäule heißen Hinterwurzelganglien-Neuronen (DRG-Neuronen)². Sie übertragen periphere Schmerzsignale der Nozizeptoren zum Rückenmark als zentralem Leitstrang für elektrochemische Signalübertragung her. Damit sind sie für die Schmerzperzeption essentiell.

Die DRG-Neuronen (Abb. 1.7A) sind pseudounipolare neuronale Zellen mit bifurkierendem Axon. Die beiden funktionellen Enden des Axons münden einerseits in peripheren und andererseits in zentralen Ästen. Während die peripheren Äste Signale aus dem peripheren Gewebe über das Axon an die zentralen Äste weiterleiten, gehen von dort zwei funktionelle Pfade aus: die lokalen Reflexäste und die aufsteigenden Äste. Lediglich die aufsteigenden Äste transportieren die Information zum Gehirn.

Für die Weiterleitung stehen wahlweise schnelle, dünn myelinisierte A δ -Fasern (30 m/s) und langsame, unmyelinisierte C-Fasern (1 m/s) zur Verfügung (Abb. 1.7B). Die Na_v1.9-Kanäle spielen vor allem für die C-Faser-vermittelte Nozizeption eine wichtige Rolle [17]. Man unterscheidet vier periphere Nozizeptorklassen nach der Art der übermittelten Signaltypen und der Leitgeschwindigkeit: thermische (A δ), mechanische (A δ), polymodale (C) und stille Nozizeptoren (C). Die polymodalen Nozizeptorstränge können sowohl mechanische als auch thermische Schmerzsignale leiten, für die stillen Nozizeptoren ist bisher keine Funktion bekannt.

Wegen der unterschiedlichen Leitgeschwindigkeiten (Abb. 1.7C) lassen sich unterschiedliche Klassen von Schmerzsignalen senden. So vermitteln durch A δ -Fasern gesandte Signale ein rasch aufkommendes und kurz anhaltendes Schmerzgefühl, welches sich klar lokalisieren lässt. Durch C-Fasern übermittelte Schmerzsignale äußern sich als brennender, lang anhaltender Schmerz, der sich schwer lokalisieren lässt.

Die Signalübertragung findet in DRG-Neuronen intrazellulär entlang des Axons durch Aktionspotentiale statt. Interzelluläre wird Weiterleitung durch Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat oder durch Cotransmitter wie u. a. Substanz P realisiert. Das erfordert eine umfangreiche Ausstattung mit Ionenkanälen. Insbesondere spannungsgesteuerte Na_v-, K_v-, Ca_v- und Chloridkanäle sowie HCN-, TRP- und Kaliumleckkanäle werden in DRG-Neuronen exprimiert [40].

²Dieser Abschnitt ist eine Zusammenfassung mehrerer Kapitel aus Kandel 2013 [3].

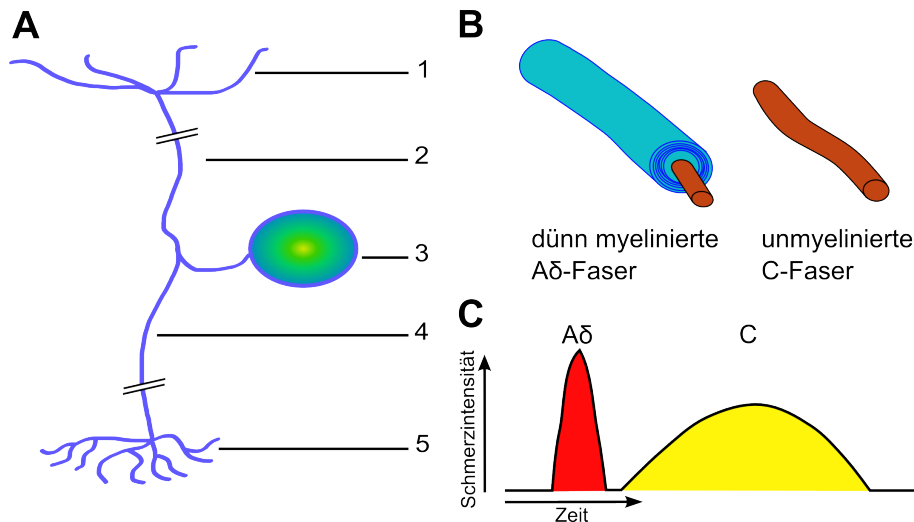


Abbildung 1.7: DRG-Neuronen sind pseudounipolare Nervenzellen, die verschiedene Schmerzsignale übertragen. **A** Schematischer Aufbau eines DRG-Neurons mit Dendriten (1), peripherem Axon zu Muskel oder Haut (2), Zellkörper (3), zentrales Axon (4) und Axontermini (5). **B** Die Axone von DRG-Neuronen können entweder dünn myelinisiert (A δ -Fasern) oder unmyelinisiert (C-Fasern) sein. **C** Abhängig vom beteiligten Fasertyp können die empfundenen Schmerzen sehr schnell und kurzzeitig (A δ -Faser) oder verzögert und langanhaltend (C-Faser) sein. Die Abbildung ist modifiziert nach Kandel 2013 [3].

1.3 Zielstellung der Arbeit

Der spannungsgesteuerte Natriumkanal hNa_V1.9 steht im Zusammenhang mit Nozizeption und wird auch für chronische und neuropathische Schmerzen verantwortlich gemacht. Daher stellt dieses Protein ein wichtiges Zielmolekül für die Schmerztherapie dar. Außerdem scheint er weiterhin Bedeutung für die Darmmotilität und in den Motorneuronen zu besitzen. Die Ursachen für das einzigartige Schaltverhalten und die physiologische Rolle von Na_V1.9-Kanälen sind noch nicht aufgeklärt.

Einerseits wird Na_V1.9 im nativen Gewebe stark zellulär reguliert, andererseits konnten Na_V1.9-Kanäle bisher nicht außerhalb von Primärzellen heterolog exprimiert werden. Neben den vielen Vorteilen, die eine Untersuchung im nativen Gewebe mit sich bringt, ergeben sich auch viele Nachteile. So enthalten DRG-Neuronen eine Vielzahl von Ionenkanälen, wodurch es nur unter bestimmten Bedingungen möglich ist, isolierte Na_V1.9-Stromantworten zu erhalten. Außerdem wurde bei der Charakterisierung von Na_V1.9 bisher weitgehend die Funktion von Nagerkanälen und nicht von humanen Kanälen untersucht. Die Herstellung von transgenen Tieren zur Untersuchung bestimmter Mutanten ist sehr aufwendig und teuer. Es ist nicht nur aus Gründen des Tierschutzes wünschenswert, das humane Protein zu untersuchen. In der Vergangenheit wurde mehrfach gezeigt,

dass zwischen unterschiedlichen Spezies funktionelle und pharmakologische Unterschiede bei Ionenkanälen auftreten.

Daher haben wir eine systematische Strategie angewendet, bei welcher hNav1.9-Domänen in heterologen Expressionssystemen (*Xenopus*-Oozyten oder eukaryotische Zelllinien) untersucht werden sollen. Wir wollen uns der Frage nach der physiologischen Funktion von Nav1.9 stellen. Ebenso sollen die Ursachen des Schaltverhaltens und die Regulation der heterologen funktionellen Expression untersucht werden. Im weiteren wollen wir herausfinden, wie hNav1.9 auf diverse Neurotoxine der Rezeptorstelle 1 reagiert. Von Interesse war weiterhin, welche Auswirkungen die analgetische Mutation L811P auf das Kanalschaltverhalten von Nav1.9 hat und ob sich die Resultate mit den Ergebnissen von Mausexperimenten vergleichen lassen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien, welche in den Experimenten Verwendung fanden, waren von hoher Reinheit und Lösungen wurden mit Millipore-Wasser (teilweise auch mit autoklaviertem Millipore-Wasser) hergestellt. Für diese Arbeit wurden insbesondere folgende Substanzen verwendet:

- 2,2'-Dithiobis(5-nitropyridin) (DTNP, Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Sigma-Aldrich)
- Lucifer Yellow (Lucifer Yellow CH Dilithiumsalz, Sigma-Aldrich)
- (2-Trimethylammoniummethyl)methanthiosulfonatbromid (MTSET, Toronto Research Chemicals Inc, Toronto, Kanada)
- Tetrodotoxin (TTX, Alomone, Jerusalem, Israel)
- Saxitoxin (STX, zur Verfügung gestellt von R. Blum)
- μ -SIIIA (UniProt-Code: Q86DU6, zur Verfügung gestellt von O. Hartley, Genf, Schweiz)

Die Chemikalien DTNP und DTNB wurden in DMSO als Stammlösungen auf 100 mM vorverdünnt und vor der Applikation mit Badlösung auf die Arbeitskonzentration von 100 μ M verdünnt. Mit Wasser wurden die Chemikalien Lucifer Yellow und MTSET zu 200 mM Stammlösungen verdünnt und vor der Verwendung weiter auf die Arbeitskonzentration 200 μ M verdünnt. TTX stand als 1 mM-Stammlösung in einem Citratpuffer zur Verfügung und wurde ebenfalls vor Verwendung mit Badlösung weiter verdünnt. STX war in einer unbekannten Konzentration und Lösung verfügbar, eine Kalibrierung ergab eine STX-Konzentration von 37 μ M. Dafür wurde STX ebenfalls in Badlösung verdünnt. Das Toxin μ -SIIIA wurde als Stammlösung mit einer Ausgangskonzentration von 500 μ M in Standardbadlösung mit 2 mg/ml BSA bereitgestellt und für die Messung zu einer Endkonzentration von 20 μ M mit ND96-Lösung weiterverdünnt. Alle weiteren Chemikalien wurden von Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland oder Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland erworben.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Gene, Expressionsplasmide, Mutanten

Für diese Arbeit wurden cDNA-Sequenzen von Genen in kommerziell erwerblichen eukaryotischen Expressionsvektoren (pcDNA3, Life Technologies; pTargeT, New England Biolabs) verwendet oder mittels molekularbiologischer Methoden manipuliert. Alle erzeugten Konstrukte basieren auf den in Tabelle 2.1 aufgeführten Ausgangsplasmiden, welche den folgenden HGNC- bzw. UniProt-Einträgen entsprachen und von den angegebenen Quellen bereitgestellt wurden.

Die Sequenz von hNa_V1.9-cDNA wurde korrigiert um die Aminosäureaustausche G576D und G847R [45]. Der DNA-Sequenz von rNa_V1.4 wurde von E. Leipold eine *NheI*- und eine *ClaI*-Schnittstelle hinzugefügt.

Tabelle 2.1: Verwendete Ausgangskonstrukte inklusive HGNC und UniProt-Daten

| Name | Vektor | Quelle | HGNC | UniProt |
|----------------------|-----------|----------------|--------|----------|
| hNa _V 1.9 | pcDNA3 | R. Blum | SCN11A | Q9UI33 |
| rNa _V 1.4 | pcDNA3 | J.S. Trimmer | SCN4A | P15390 |
| hNa _V 1.7 | pcDNA3 | N. Klugbauer | SCN9A | Q15858 |
| hNa _V 1.8 | pCMV6_XL5 | OriGene | SCN10A | Q9Y5Y9.2 |
| hSCN1B | pTargeT | O. Goral | SCN1B | Q07699-1 |
| hSCN3B | pcDNA3 | E. Leipold | SCN3B | Q9NY72 |
| hTACR3 | pTargeT | OpenBiosystems | TACR3 | Q4VBL9 |

2.2.2 Konstruktion von Kanalchimären

Für die elektrophysiologische Untersuchung von hNa_V1.9 wurde ein Bausatz von Kanalchimären bestehend aus Fragmenten von hNa_V1.9 im Hintergrund von rNa_V1.4 hergestellt. 9444, 4944, 4494, 44(94)4, 44(49)4, 4449, 4444_C9, 9999_C4 und 9999_C4_SY wurden von E. Leipold durch eine PCR-Strategie erstellt [29]. Die Chimäre 4449_C4 wurde von mir erstellt und die Chimäre 4944 wurde von mir korrigiert.

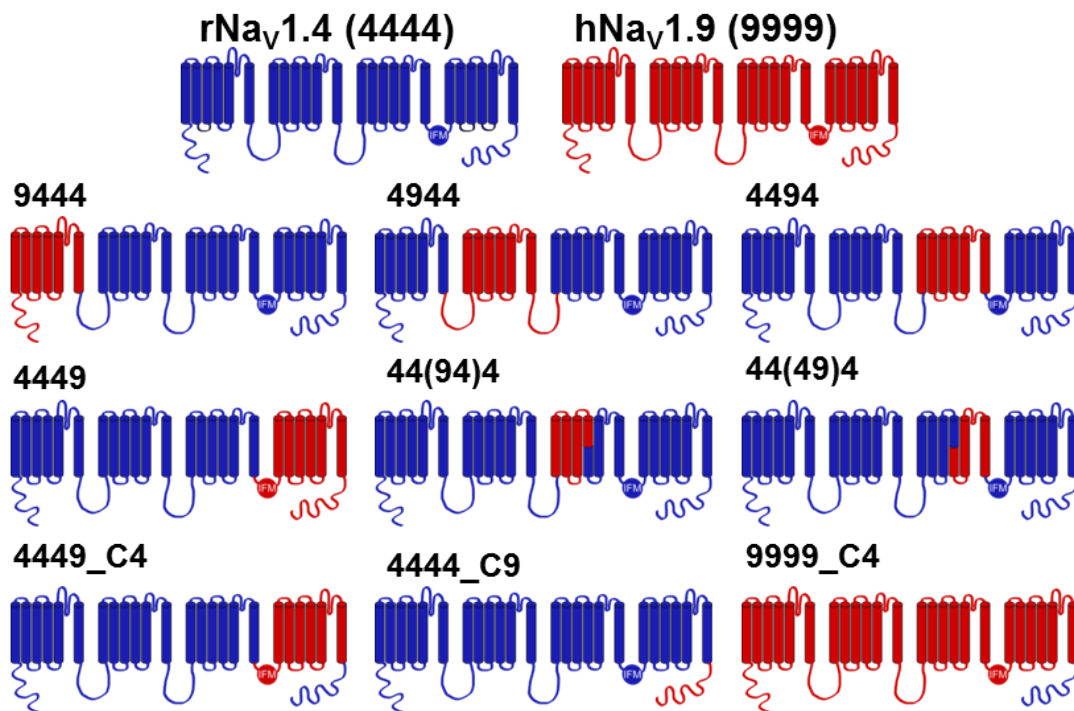


Abbildung 2.1: Kanalchimären von hNav_{1.9} im rNav_{1.4}-Hintergrund. Proteinbestandteile von rNav_{1.4} blau, Proteinbestandteile hNav_{1.9} rot. 9444 N-Terminus und DI. 4944 DII/DIII-Linker sowie DII und DII/DIII-Linker. 4494 S1-S6 von DIII. 4449 DIII/DIV-Linker sowie DIV und C-Terminus. 44(94)4 S1-S4 von DIII. 44(49)4 S4-S6 von DIII. 4449_C4 DIII/DIV-Linker und DIV. 4444_C9 C-Terminus. 9999_C4 C-Terminus von rNav_{1.4} im Hintergrund von hNav_{1.9}.

Die Vorgehensweise für 4944 sah dabei so aus, dass DII aus dem Ausgangsklon mittels PCR durch die Primer 2292 und 2295 amplifiziert wurde. Die PCR-Primer wurden so gestaltet, dass an gewünschten Stellen durch stille Mutagenese Restriktionsschnittstellen eingebaut wurden, um die Ligation und eventuelle weiterreichende Mutationen einfacher vornehmen zu können.

Für die Amplifikation wurden grundsätzlich Polymerasen herangezogen, welche eine *proof-reading*-Aktivität besitzen: Expand High Fidelity PCR Kit (Roche), *Pfu* Polymerase PCR Kit (Thermo), Phusion PCR Kit (NEB). Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel durch Gelelektrophorese aufgetrennt und mit dem Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) aufgereinigt. Anschließend erfolgte eine Ligation in pGem-T (Promega) mit *T4*-Ligase (Thermo) bei 4 °C über Nacht. Es wurden chemisch kompetente *E. coli* vom Stamm XL-1 (Agilent) mit den Ligationsansätzen transformiert und auf Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin, IPTG und X-Gal ausgespatelt und bei 32 °C über Nacht inkubiert. Einzelkolonien wurden am nächsten Tag gepickt und in Reagenzgläsern mit TY-Medium versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin bei 32 °C über Nacht geschüttelt. Die Aufreinigung der gewonnenen DNA erfolgte mit dem Pure Yield Mini Prep System (Promega) und mit DNA Cycle Sequencing Kit (Jena Bioscience) sowie einem LiCor 4300 Gelsequenzierer

wurden diese Klone auf ihre korrekte Basenabfolge untersucht.

Von den korrekten Klonen wurden 100 ml Schüttelkulturen angesetzt, welche nach Inkubation bei 32 °C über Nacht mit dem Pure Yield Midi Prep System ebenfalls aufgereinigt wurden. Mittels Restriktionsverdau (Restriktionsenzyme von NEB, Enzymkombination siehe Tabelle 2.2) wurden die einzelnen Domänen ausgeschnitten, aufgereinigt und in die analog vorbereiteten Zielvektoren ligiert. Die Verwendung aller aufgeführten Kits erfolgte nach Herstelleranleitung.

Tabelle 2.2: Verwendete Restriktionsenzymkombinationen zum Einbau der ausgetauschten Kanalbestandteile

| Kanalchimäre | Enzym 5' | Enzym 3' |
|--------------|---------------|---------------|
| 9444 | <i>Mlu</i> I | <i>Bst</i> WI |
| 4944 | <i>Bst</i> WI | <i>Nhe</i> I |
| 4494 | <i>Nhe</i> I | <i>Cla</i> I |
| 44(94)4 | <i>Nhe</i> I | <i>Afl</i> II |
| 44(49)4 | <i>Afl</i> II | <i>Cla</i> I |
| 4449 | <i>Cla</i> I | <i>Xba</i> I |
| 4449_C4 | <i>Bsr</i> GI | <i>Xba</i> I |
| 4444_C9 | <i>Bsr</i> GI | <i>Xba</i> I |
| 9999_C4 | <i>Bsr</i> GI | <i>Xba</i> I |

Tabelle 2.3: Grenzen der hNav1.9-Bestandteile in den hergestellten Kanalchimären, wobei die Aminosäureposition der Position der in Tabelle 2.1 angegeben hNav1.9-Isoform entspricht.

| Kanalchimäre | Beginn hNav1.9-Bestandteil | Ende hNav1.9-Bestandteil |
|--------------|----------------------------|--------------------------|
| 9444 | Methionin 1 | Alanin 402 |
| 4944 | Tyrosin 403 | Alanin 1072 |
| 4494 | Leucin 1073 | Isoleucin 1308 |
| 44(94)4 | Leucin 1073 | Threonin 1148 |
| 44(49)4 | Leucin 1149 | Isoleucin 1308 |
| 4449 | Isoleucin 1308 | Aspartat 1791 |
| 4449_C4 | Isoleucin 1308 | Leucin 1604 |
| 4444_C9 | Aspartat 1605 | Aspartat 1791 |
| 9999_C4 | Methionin 1 | Leucin 1604 |

2.2.3 Mutagenese des IFM-Linkers

Für die Herstellung von 9999_IFC bzw. 9999_C4_IFC wurde mittels PCR (Expand High Fidelity PCR Kit von Roche) ein Fragment mit den Primern 3728 und 3729 aus hNa_V1.9 amplifiziert und in pGem-T subkloniert. Nach Überprüfung der Basenabfolge durch Sequenzierung wurde mit dem QuikChange Site-Directed Mutagenesis PCR Kit unter Verwendung der Primer 3730 und 3731 die zielgerichtete Mutagenese-PCR durchgeführt. Durch Sequenzierung wurde die korrekte Basenabfolge überprüft und anschließend wurden dam-/dcm-methylierungsnegative *E. coli* vom Stamm 2925i (NEB) mit dem korrekt mutierten Klon bzw. der Zielvektor-DNA transformiert, da eine *Cla*I-Schnittstelle dam-methyliert vorlag. In ein mit *Cla*I geschnittenes und mit Fast AP (Thermo) dephosphoryliertes 9999_C4- bzw. hNa_V1.9-DNA-Rückgrat wurde das Fragment nach Restriktionsverdau mit *Cla*I ligiert.

Der Aminosäureaustausch von IFM zu IQM bei 9999 oder 999_C4 erfolgte durch *Overlap Extension* PCR mit den Primern 3728 und 3899 sowie 3898 und 3729 für hNa_V1.9 (Phusion High Fidelity PCR Kit NEB). Die entsprechenden PCR-Produkte wurden bei hNa_V1.9 bzw. h9999_C4 nach *Cla*I-Verdau in den Zielvektor ligiert.

Die Kanalmutante rNa_V1.4_IFC wurde von E. Leipold zur Verfügung gestellt. Bei rNa_V1.4 erfolgte die Mutagenese von IFM zu IQM durch die Amplifikation des in pGem-T subklonierten DIV-Fragmentes mittels QuikChange Mutagenese-PCR mit den Primern 3900 und 3901. Anschließend wurde das mutierte Fragment in rNa_V1.4 ligiert.

Das IFM-Motiv der Kanalchimären konnte analog zur Chimärenherstellung selbst verändert werden. Dazu war es lediglich notwendig, die entsprechenden hNa_V1.9-Domänen in rNa_V1.4_IQM bzw. rNa_V1.4_IFC zu ligieren. Nur die 4449-Chimäre musste erneut kloniert bzw. mutiert werden. Für 4449_IFC wurde aus 9999_IFC mit den Primern 2592 und 2593 die Domäne 4 amplifiziert und nach *Cla*I-Verdau in den Zielvektor eingesetzt. Die Chimärenmutante 4449_IQM wurde durch *Overlap Extension* PCR mit den Primern 2592 und 3899 sowie 3838 und 2593 hergestellt.

2.2.4 Mutationen in Neurotoxin-Rezeptorstelle 1

Für toxikologische Untersuchungen war es notwendig, die Aminosäureposition S360 (in hNa_V1.9) mit dem größten Einfluss auf die TTX/STX-Sensitivität, zu mutieren [54]. Dazu wurde aus dem korrigierten hNa_V1.9-Klon ein Fragment durch *Overlap Extension* PCR (Phusion High Fidelity PCR Kit) mit den Primern 2803 und 2800 sowie 2799 und 2804 amplifiziert und als S360Y in 9999_C4_IFC ligiert. In 9999_C4_IFC_SY wurde ein durch *Bsp*EI und *Cla*I ausgeschnittenes DNA-Fragment aus 9999_C4_IQM ligiert, um das IFC-Motiv durch IQM zu ersetzen.

Für die funktionelle Kanalexpression in neuronalen Zellen wurde eine TTX-resistente Mutante (Y401S) von rNa_V1.4 (bereitgestellt von E. Leipold) verwendet, mit der die

Herstellung von TTX-resistenten Kanalchimären analog zur eigentlichen Chimärenkonstruktion durchgeführt werden konnte.

Übersicht der verwendeten Primer

Tabelle 2.4: Übersicht der verwendeten Primer mit Namen und *Annealing*-Temperatur

| # | Sequenz | Name | T _a |
|------|--|----------------|----------------|
| 2292 | CCATGGCGTACGAGGAGCAGAACAAG | 4944_korr_fwd | 65 |
| 2295 | CTTCAAATGCTAGCGCCCCACTGCTCAGCAGAATC | 4944_korr_b | 75 |
| 2592 | GCGTTATCATCGATAACTTCAACCAACAG | NaN_D4_fwd | 60 |
| 2593 | GAATAGGGCCCTCTAGAGGGCAAGGCTGTG | NaN_D4_b | 70 |
| 2799 | GCTGATGACCCAAGATTACTGGGAGAAGCTTTATCAAC | hNaN_S360Y_fwd | 70 |
| 2800 | GTTGATAAAGCTTCTCCAGTAATCTTGGGTCATCAGC | hNaN_S360Y_b | 70 |
| 2803 | GCTTGGTACCGAGCTCGGATCC | hNaN_KpnI_fwd | 60 |
| 2804 | GAACCATCTCAGGTAACCATCCAAAGC | hNaN_BstEII_b | 60 |
| 3728 | GGCCAGGAAACTAAAGTCCAG | hNaN_ClaI_fwd | 60 |
| 3729 | GAGCATGCTGCTGGCAAAAG | hNaN_ClaI_b | 60 |
| 3730 | GTGGCCAAGACATTTTTTGTACAGAAGAACAGAAG | hNaN_IFC_fwd | 70 |
| 3731 | CTTCTGTTCTTCTGTACAAAAAATGTCTTGGCCAC | hNaN_IFC_b | 70 |
| 3898 | GTGGCCAAGACATTCAGATGACAGAAGAACAGAAG | h_NaN_IQM_fwd | 70 |
| 3899 | CTTCTGTTCTTCTGTCTCATCTGAATGTCTTGGCCAC | h_NaN_IQM_b | 70 |
| 3900 | GAGGGAAAGACATCCAGATGACAGAGGAACAGAAG | rmu1_IQM_fwd | 70 |
| 3901 | CTTCTGTTCTTCTGTCTCATCTGGATGTCTTCCCTC | rmu1_IQM_b | 70 |

2.2.5 RNA-Synthese

Für die mRNA-Synthese wurde Plasmid-DNA mit *AvrII* (rNav1.4, hNav1.7, alle Kanalchimären außer 9999- bzw. 9999_C4-Konstrukte), *AgeI* (hNav1.8), *SmaI* (alle 9999- bzw. 9999_C4-Konstrukte) oder *BspEI* (hSCN1B) linearisiert, mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Carl Roth) sowie Isopropanol (Carl Roth) aufgereinigt und mit dem mMessage mMachine T7-Kit (Ambion, nach Anleitung) weiterbearbeitet. Die mRNA-Qualität wurde auf einem 1% Agarose-MOPS-Formaldehyd-Gel überprüft. War eine deutlich sichtbare Einzelbande zu erkennen, wurde die mRNA ohne Konzentrationsbestimmung verwendet.

2.3 Elektrophysiologische Methoden

2.3.1 Oozytenpräparation und mRNA-Injektion

Es wurden *Xenopus*-Oozyten von adulten, weiblichen *Xenopus laevis* (Nasco) verwendet. Die Frösche wurden im Einklang mit den deutschen Gesetzen zum Tierschutz behandelt.

Die Entnahme der Oozyten wurde unter Tricain-Narkose auf Eis durch einen Schnitt im lateralen Abdomen vorgenommen. Bereits operierte Tiere konnten nach 6 Monaten Ruhezeit wieder eingesetzt werden. Der entnommene Ovariallappen wurde mit der Schere zerkleinert und anschließend in Ca^{2+} -freiem Barth's Medium mit Collagenase A (Worthington Biochemicals) vom Bindegewebe befreit. Oozyten der Stadien V/VI wurden von umschließenden Häuten (mit Ausnahme der Vitellinhülle) manuell befreit.

In entsprechend vorbereitete Oozyten wurden laut Herstellerangabe 50.6 nl^1 RNA-Lösung mithilfe eines Nanoliter-Injektors (WPI) injiziert. Die dafür notwendigen Injektionspipetten (WPI Injection Glass Replacement) wurden an einem List-Elektronik Vertikalpuller ausgezogen, für 2 Stunden bei 200°C gebacken und nach dem Abkühlen manuell an der Spitze abgebrochen.

Injizierte Oozyten wurden in Barth's Medium mit CaCl_2 und Antibiotika (Penicillin und Streptomycin (PAA) mit Zefuroxim (Hikma) bzw. Gentamicin (PAA)) für 5 bis 7 Tage bei 17°C inkubiert.

Tabelle 2.5: Verwendete mRNA-Verdünnungen für Mikroinjektion in *Xenopus*-Oozyten

| mRNA | Verdünnung | mRNA | Verdünnung |
|----------|------------|------------------|------------|
| 4444 | <1:400 | 44(94)4 | 1:10 |
| 4444_IQM | 1:10 | 44(49)4 | 2:1 |
| 4444_IFC | <1:400 | 4449 | 1:10 |
| hNav1.7 | 1:10 | 4449_IFC | 1:10 |
| hNav1.8 | 1:10 | 4449_IQM | 2:1 |
| hNav1.9 | 2:1 | 4449_C4 | 1:10 |
| 9444 | 1:10 | 4444_C9 | 1:20 |
| 9444_IFC | 1:10 | 9999_C4 | 1:10 |
| 9444_IQM | 1:10 | 9999_C4_IFC | 1:10 |
| 4944 | 2:1 | 9999_C4_IFC_SY | 1:10 |
| 4944_IFC | 2:1 | 9999_C4_IQM | 1:10 |
| 4944_IQM | 2:1 | 9999_C4_IQM_SY | 1:10 |
| 4494 | 2:1 | 9999_C4_L811P | 1:10 |
| 4494_IFC | 2:1 | 9999_C4_L811P_SY | 1:10 |
| 4494_IQM | 2:1 | 4444_D400N | 2:1 |

Sofern es nicht anders angegeben ist, wurde zur entsprechenden Natriumkanal- α -Untereinheit anteilig hSCN1B (das Verhältnis $\alpha:\beta$ entspricht 2:1) zugegeben und vermischt injiziert. Es war der unterschiedlichen Expressionsstärke der verschiedenen Na^+ -Kanäle geschuldet, dass jede mRNA verschieden stark mit DEPC-Wasser verdünnt wurde (siehe Tabelle 2.5). Bei den Verdünnungen 2:1 wurde jedoch die SCN1B-mRNA zur Verdünnung eingesetzt.

¹In der gesamten Arbeit wird der Punkt anstatt von Komma als Dezimaltrennzeichen verwendet.

2.3.2 Zweielektroden-Spannungsklemme

Die Zweielektroden-Spannungsklemme (TEVC) ist eine elektrophysiologische Methode zur Untersuchung von Stromflüssen über Biomembranen bei vorgegebenen Membranspannungen. Auch die Messung von *Xenopus*-Oozyten mittels TEVC basiert weitgehend auf dem Prinzip, welches von Cole und Curtis entwickelt sowie von Hodgkin und Huxley verwendet wurde [2, 62]. Im Gegensatz zum Riesenaxon von Tintenfischen enthalten *Xenopus*-Oozyten jedoch nur wenige endogene Ionenkanäle und können durch mRNA-Injektion große Mengen Protein mit vielen wichtigen posttranslationalen Modifikationen (Glykosylierung, Phosphorylierung) produzieren [77].

Der in Abb. 2.2 vereinfacht dargestellte Aufbau einer Messapparatur soll das Funktionsprinzip erklären. Insgesamt gibt es vier Ag/AgCl-Elektroden, davon sind zwei direkt in die Badlösung eingetaucht und dienen dem Abgleich des Badpotentials. Die beiden anderen Elektroden verbinden den Verstärker mit dem Cytoplasma der Oozyte über 2 M KCl-Lösung gefüllte Glaskapillaren. Eine dieser Elektroden injiziert Strom in die Oozyte, um die Membran aufzuladen - diese Elektrode wird Stromelektrode genannt. Die andere Elektrode wird als Spannungselektrode bezeichnet. Diese misst die Spannung, welche an der Membran anliegt.

Mithilfe der Software PATCHMASTER wird der Verstärker dazu veranlasst, Kommandospannungen (U_{Kommando}) an die Oozytenmembran anzulegen. Das geschieht dadurch, dass die Stromelektrode so lange Strom injiziert, bis die erzwungene Membranspannung an der Spannungselektrode gemessen wird. Über einen Rückkopplungsmechanismus wird die Strominjektion in Abhängigkeit von der anliegenden Membranspannung reguliert.

Für TEVC-Messungen wurde ein Messstand mit einem TurboTec-10CD-Verstärker (np electronic, Tamm, Deutschland) verwendet. Das Gerät war über die Schnittstelle ITC-18 mit einem PowerMac G4 verbunden, auf welchem die Software PATCHMASTER v2.21 den Messvorgang steuerte.

Mit einem Vertikalpuller (L/M-3-P-A) wurden Borosilikatglas-Kapillaren mit Filament (Hilgenberg) ausgezogen und mit 2 M KCl-Lösung gefüllt. Die Pipettenwiderstände (R_{Pot} und R_{Curr}) betrug 0.4 bis 0.8 M Ω . Die *Xenopus*-Oozyten wurden in eine mit Faradaykäfig abgeschirmte und schwingungsgedämpfte Badkammer mit ND96-Lösung gegeben. Im Current Clamp-Modus wurden die Pipetten mit Maerzhäuser-Mikromanipulatoren in die Badlösung gefahren. Es erfolgte der Abgleich der beiden Ag/AgCl-Elektroden auf 0 mV, bevor die Pipetten synchron und vorsichtig in die Oozyten eingestochen wurden. Im Anschluss wurde der Verstärker in den Voltage Clamp-Modus versetzt.

Die Oozyten wurden üblicherweise bei einem Haltepotential von -80 mV gemessen. Nach dem Einstellen des Haltepotentials wurde den Kanälen 1 min Zeit zur Erholung gegeben. Anschließend wurde mithilfe eines I(V)-Protokolls die Strommenge quantifiziert. Die TEVC-Messungen erfolgten in ND96-Lösung: 96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM

MgCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH = 7.4 (HCl).

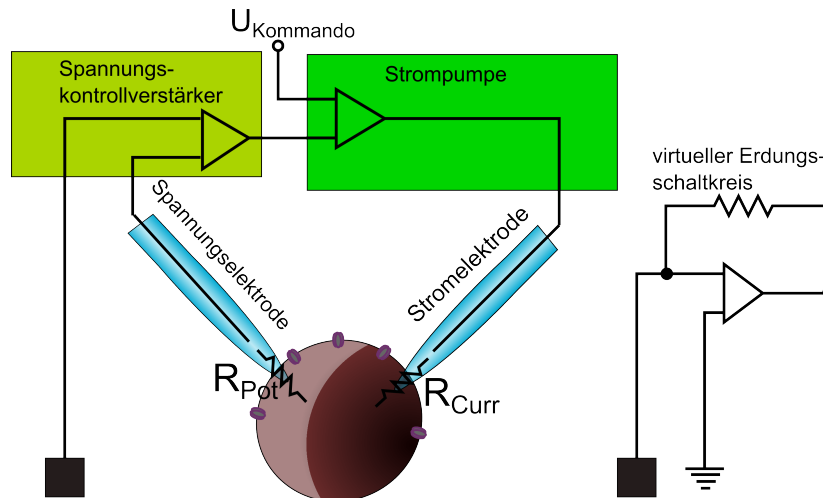


Abbildung 2.2: Die Zweielektroden-Spannungsklemme ist eine elektrophysiologische Methode zur Untersuchung von Ionenkanalströmen in Membranen von *Xenopus-Oozyten*. Der Messstand besteht aus einer Probenkammer, die mit Badlösung gefüllt ist, insgesamt vier Elektroden, einem Verstärker und einem Computer. Von den Elektroden sind zwei dauerhaft in die Badlösung eingetaucht und für die Erdung oder den Spannungsabgleich verantwortlich. Die beiden anderen dienen in Pipetten mit 2 M KCl gehüllt zum Einstechen in die Oozyten. Eine von diesen injiziert Strom um die Membran aufzuladen (Stromelektrode), die andere liest die Membranspannung der Oozyte ab und vergleicht diese mit der Sollspannung (Spannungselektrode). Diese beiden Elektroden werden durch Mikromanipulatoren in Position gebracht. Darüberhinaus werden ein einfaches Mikroskop und zwei Mikromanipulatoren benötigt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Dascal 2001 [77].

2.3.3 Zellkulturarbeiten

Die ND7/23-Zellen (bereitgestellt von C. Nau) wurden in 250 ml-Flaschen mit DMEM (mit 4,5 g/l D-Glucose, L-Glutamin (Gibco) und 10% FCS (Biochrom)) in einem Vollhumidinkubator bei 37 °C und 10% CO₂ kultiviert. Flaschen mit ca. 90% Konfluenz wurden zum Aussäen der Zellen für die Patch-Clamp-Experimente weiterverwendet. Nach der Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und im Anschluss mit 3 ml Trypsin + EDTA-Lösung (Gibco) behandelt. Die Proteasereaktion wurde nach 2 min mit 12 ml frischem Kulturmedium abgestoppt. Zur Vereinzelung der Zellen wurden sie mithilfe einer 10 ml-Pipette gemischt. Von dieser Suspension wurde 1 ml in 16 ml Kulturmedium verdünnt und auf 8 mit Gelatine beschichtete Petrischalen verteilt.

Nach Kultivierung über Nacht bei 37 °C und 10% CO₂ wurden die Zellen mit einer Suspension aus DNA (2 µg pro Petrischale), Rotifect (Carl Roth, 2 µl pro Petrischale)

und Kulturmedium nach Anleitung transfiziert. Zur Detektion transfizierter Zellen wurden die Zellen zusätzlich mit CD8-DNA (im Verhältnis Kanal:CD8 20:1) transfiziert. Die Transfektion erfolgte über Nacht bei 37 °C und 10% CO₂. Zur funktionellen Expression von hNa_v1.9- und 9999_C4-Proteinen wurden die Zellen nach erneutem Mediumwechsel in einen Vollhumidinkubator bei 28 °C und 5% CO₂ über Nacht behandelt [8].

Vor der Messung der jeweiligen Petrischale wurde diese für 1 h bei 37 °C und 10% CO₂ inkubiert, um den Zellen die Möglichkeit zur Erholung zu geben. Anschließend wurden mit CD8-Antikörpern beschichtete 4.5 µm-Dynabeads (Dyna, Invitrogen) mit Kulturmedium gemischt und auf die Zellen gegeben, um transfizierte Zellen sichtbar zu machen. Dann wurde das Kulturmedium durch Standardbadlösung ersetzt.

Für HEK293T-Zellen (bereitgestellt von C. Fahlke) wurde eine analoge Herangehensweise unter der Verwendung von DMEM (4.5 g/l Glucose, mit L-Glutamin)+Ham's F12 (1:1) (Gibco) mit 10% FCS und Kultivierung bei 37 °C und 5% CO₂ genutzt.

2.3.4 Patch-Clamp

Die Patch-Clamp-Methode wurde von Sakmann & Neher entwickelt und von Hamill verbessert, um Stromflüsse ausgelöst durch Ionenkanäle an Einzelzellen oder Zellbestandteilen zu untersuchen [32, 37]. Unter bestimmten experimentellen Voraussetzungen wird es sogar möglich, Einzelkanalereignisse zu detektieren. Eine funktionelle Untersuchung der Proteineigenschaften auf Molekülebene kann bisher nur durch wenige andere biophysikalische Methoden vorgenommen werden.

Ein vereinfachter Aufbau eines Teils der Messapparatur ist in Abb. 2.3 dargestellt. Die Badelektrode dient als Referenzelektrode. Über die elektrolytgefüllte Patchpipette wird die Patch-Elektrode (und damit die nachgeschaltete Elektronik) mit der Zelle verbunden. Mithilfe dieser elektrischen Verbindung kann die Membranspannung der Zelle manipuliert werden. Anders als bei TEVC-Messungen werden Strominjektion und Spannungskontrolle über eine Elektrode durchgeführt. Die zu erwartenden elektrischen Ströme liegen im Pico- bis Nanoampere-Bereich und die Kapazität der Zellmembran (C_{Membran}) ist klein genug, um schnelle Spannungsänderungen der Membran zu messen und zu korrigieren. Dafür müssen die elektrische Verbindung zur Zelle über die Pipette (R_{Pip}) und die Integrität der Zellmembran hinsichtlich des elektrischen Widerstands (R_{Membran}) optimal sein.

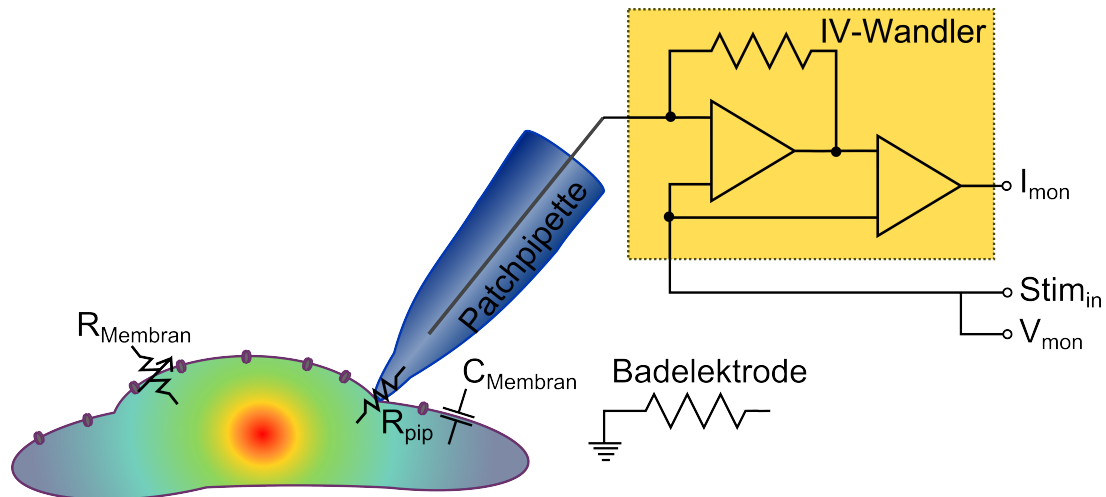


Abbildung 2.3: Der vereinfachte Aufbau eines Patch-Clamp-Messstands für Spannungsklemme-Messungen im Ganzzell-Modus (am Beispiel des EPC10-Verstärkers). Zum Zellinneren wird eine Verbindung über elektrolytgefüllte Patchpipette hergestellt. Die Kapazität der Membran (C_{Membran}) ist ein Maß für die Größe der Zelle und der Membranwiderstand (R_{Membran}) definiert die Dichte der Zelle. Schematische Darstellung des Strom-Spannungswandlers (IV-Wandlers), welcher Stromflüsse in Stromsignale wandelt. Diese Signale können am Ausgang I_{mon} aufgenommen werden. Die Ladung der Membran erfolgt über den Ausgang Stim_{in} . Über den Ausgang V_{mon} wird das Pipettenpotential bestimmt. Die Badelektrode dient als Referenzelektrode und Erdung. Die Abbildung ist dem EPC10-Handbuch in modifizierter Form entnommen [33].

Für Patch-Clamp-Messungen standen ein EPC9- bzw. EPC10-Verstärker (HEKA Elektronik) zur Verfügung. Die Steuerung erfolgte über die Software HEKA PATCHMASTER Version 2x65 installiert auf einem Apple iMac. Alle Komponenten des Messstands waren geerdet und schwingungsgedämpft auf einem Luftkissentisch (Physik Instrumente) angebracht. Ein Faraday-Käfig sorgte für die Abschirmung von externen Störsignalen. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (20 bis 25 °C) durchgeführt. Von den zwei verfügbaren Modi (Strom- und Spannungsklemme) wurde die Spannungsklemme angewendet.

Die Patch-Pipetten mit einem Widerstand von 1.5 bis 2.5 M Ω wurden aus Kimax-51 Borosilikatglas (Gerresheimer) mithilfe eines Sutter P97 Horizontalpullers (Sutter Instruments) gezogen, mit RTV 618 beschichtet und die Öffnung durch Anschmelzen mit einem glühenden Platin-Iridium-Draht poliert.

Die Petrischalen, in denen die transfizierten Zellen gewachsen waren, wurden in der Halterung eines Axiovert 100-Mikroskops (Carl Zeiss) befestigt. Mithilfe eines Luigs & Neumann SM-5-Mikromanipulators wurden mit Pipettenlösung befüllte Patch-Pipetten zur Zelle hin bewegt. Vor dem Aufsetzen auf einer Zelle wurde das Pipetten-Elektrodenpotential (Ag/AgCl) mit dem der Badelektrode (Ag/AgCl) abgeglichen. Mithilfe einer Pumpe

(MPCU-3, Lorenz Messgerätebau) wurde die Zelle angesaugt, bis eine sehr dichte Verbindung zwischen Zelle und Pipette mit einem elektrischen Widerstand $>1\text{ G}\Omega$ bestand - der sogenannte *Giga-Seal*. Mithilfe von PATCHMASTER wurde die Kapazität der Patch-Pipette mithilfe der Option C_{fast} kompensiert. Anschließend wurde in PATCHMASTER vom *On Cell*-Modus in den *Whole Cell*-Modus gewechselt und die Kontrollspannung auf -50 mV eingestellt. Durch kräftiges Saugen wurde die Zellmembran an der Verbindungsstelle zerstört und eine elektrische Verbindung zur Zelle hergestellt. Mit der Option C_{slow} wurden die langsamen kapazitiven Ströme (Transienten) der Zellmembran kompensiert und der Zugangswiderstand R_S gemessen. Nur Zellen mit $R_S < 5\text{ M}\Omega$ wurden für Patch-Clamp-Messungen verwendet. Nach dem Herstellen einer elektrischen Verbindung zum Zellinneren wurde die Kommandospannung auf -90 mV eingestellt und die Stoppuhr gestartet. Während der Zelldialyse wurde die Kommandospannung innerhalb von 3 bis 4 Minuten auf die Messspannung von -130 bzw. -140 mV gebracht. Mithilfe von kurzen Depolarisationen wurde die Kanalexpression der Zelle detektiert. Je nach Konstrukt konnten Stromsignale erst nach 5 min Wartezeit detektiert werden. Zellen ohne Stromsignale wurden verworfen. Nach 10 min Wartezeit wurden Spannungsfehler aufgrund des Zugangswiderstandes durch die Option R_S -Kompensation um bis zu 85% kompensiert. Die Messung selbst wurde im Anschluss begonnen.

Für Experimente, bei denen Redoxmittel in der Patch-Pipette vorhanden waren, wurde anstatt der normalen Pipettenelektrode eine Halbmikroagarelektrode verwendet um die AgCl-Schicht vor Zersetzung zu schützen. Bei dieser besonderen Elektrode umhüllt ein $520\text{ }\mu\text{m}$ Polyimin-Zylinder (MicroLumen, Oldsmar, USA) gefüllt mit 2 M KCl -Agar-Lösung den chlorierten Silberdraht. Die Badelektrode wurde durch die Verwendung einer Agarbrücke vor Beschädigung bewahrt. Es wurden die folgenden Lösungen verwendet:

- Standard-Badlösung: 150 mM NaCl , 2 mM KCl , $1,5\text{ mM CaCl}_2$, 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES , $\text{pH} = 7,4$ (NaOH); Bei Patch-Clamp-Messungen mit ND7/23-Zellen wurden 300 nM TTX hinzugefügt, bei Messungen in HEK293T-Zellen wurden in Verbindung mit Lösung IL1 oder IL2 $1\text{ }\mu\text{M TTX}$ verwendet.
- Standard-Pipettenlösung 1: 105 mM CsF , 35 mM NaCl , 10 mM EGTA , 10 mM HEPES , $\text{pH} = 7,3$ (CsOH)
- Standard-Pipettenlösung 2: 105 mM CsCl , 35 mM NaCl , 10 mM EGTA , 10 mM HEPES , $\text{pH} = 7,3$ (CsOH)
- Pipettenlösung IL1: 130 mM CsCl , $0,5\text{ mM CaCl}_2$, $1,5\text{ mM MgCl}_2$, 10 mM EGTA , 10 mM HEPES , $\text{pH}=7,3$ (Die Lösung enthält $54,6\text{ nM}$ freies Ca^{2+} , was berechnet wurde mit Maxchelator v1.2: <http://www.stanford.edu/~cpatton/downloads.htm>)
- Pipettenlösung IL2: 100 mM CsCl , 30 mM CsF , $0,5\text{ mM CaCl}_2$, $1,5\text{ mM MgCl}_2$, 10 mM EGTA , 10 mM HEPES , $\text{pH}=7,3$

Sofern es nicht anders beschrieben ist, wurde für Patch-Clamp-Messungen üblicherweise

die Kombination aus Standard-Badlösung und Standard-Pipettenlösung 1 verwendet.

2.4 Datenakquisition und -analyse

2.4.1 Pulsprotokolle

Aufnahme von Strom-Spannungskennlinien $I(V)$

Zur Untersuchung der Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung von Na_V -Kanälen wurden Strom-Spannungskennlinien aufgenommen. Dabei diente eine Serie von Rechteckpulsen (50 bzw. 80 ms Dauer) ausgehend vom Haltepotential auf unterschiedliche Membranspannungen (Abb. 2.4A) dazu, die Kanalaktivität in Abhängigkeit von der Spannung zu quantifizieren. Nach der Depolarisation wurde die Zelle bei Haltepotential für drei bis zehn Sekunden konditioniert, um den Kanälen die Möglichkeit zur Erholung aus dem inaktivierten Zustand zu geben. Im Anschluss wurde die nächste Depolarisation mit einer um 10 mV erhöhten Spannungsamplitude durchgeführt. Das wurde so oft wiederholt, bis 60 mV erreicht wurden.

In Abb. 2.4B sind beispielhafte Stromantworten dargestellt. Während die Kanäle bei Spannungen um das Ruhemembranpotential geschlossen vorliegen, steigt der Na^+ -Strom ab -30 bis 10 mV stetig an. Danach wird der Einstrom wieder kleiner, bis er ab 50 mV in einen Auswärtsstrom umgekehrt wird.

In Abb. 2.4C sind die Stromextrema der jeweiligen Depolarisationen über der entsprechenden Membranspannung aufgetragen. Diese Punktabfolge ergibt eine Kurve, an die eine Strom-Spannungskennlinie nach einem Hodgkin-Huxley-Formalismus mit $m=3$ aktivierenden Schaltstellen angepasst werden kann:

$$I(V) = \frac{1}{(1 + e^{-\frac{V-V_m}{k_m}})^3} \cdot (V - E_{rev}) \cdot \omega \quad (2.1)$$

mit dem Strom als Funktion der Membranspannung $I(V)$, der Membranspannung V , der halbmaximalen Aktivierungsspannung pro Schaltstelle V_m , der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung k_m , dem Umkehrpotential E_{rev} und dem Einzelkanalleitwert ω .

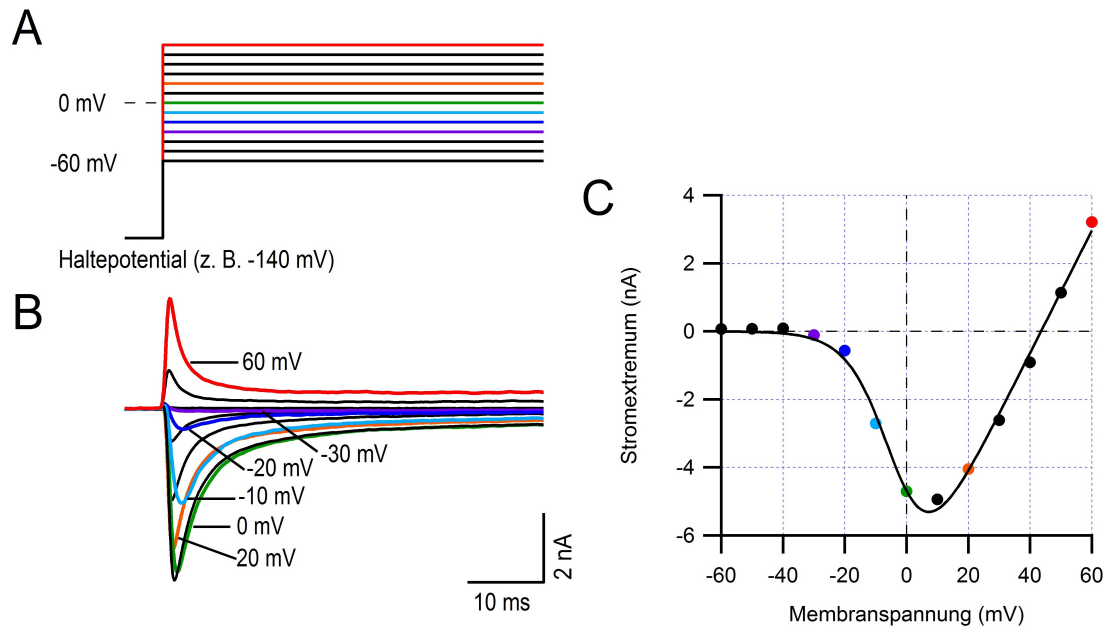


Abbildung 2.4: Die Messung einer Strom-Spannungskennlinie $I(V)$ erfolgt durch Membrandepolarisation mit Rechteckpulsen auf unterschiedliche Spannungen. **A** Typisches Pulsprotokoll für $I(V)$ -Messungen ausgehend von einem Haltepotential von z. B. -140 mV. Depolarisationen erfolgen in 10 mV-Abständen auf -60 bis 60 mV. Zwischen jeder Depolarisation wird die Zelle für einige Sekunden bei Haltepotential konditioniert. **B** Stromantworten ausgelöst durch Membrandepolarisationen sind der Übersichtlichkeit wegen in verschiedenen Farben hervorgehoben und mit den entsprechenden Membranspannungen markiert. **C** Stromextrema jedes Spannungspulses aufgetragen über der Membranspannung ergeben $I(V)$ -Kurve mit den Parametern halbmaximale Aktivierungsspannung pro Schaltstelle V_m , Spannungsabhängigkeit k_m und Umkehrpotential E_{rev} .

Charakterisierung der Gleichgewichtsinaktivierung

Die Gleichgewichtsinaktivierung wurde mit einem h_∞ -Pulsprotokoll (Abb. 2.5A) untersucht. Bei diesem wurde ausgehend vom Haltepotential zunächst eine Depolarisation (Testpuls 1) zur Bestimmung des Minimalstroms gepulst. Im Anschluss wurden die Kanäle für 500 ms bei wechselnden Membranspannungen (-140-10 mV) in 10 mV-Schritten konditioniert. Je stärker depolarisiert Konditionierungsspannung war, desto kleiner war der Anteil von aktivierbaren Kanälen. Diese Anteile wurden durch einen weiteren Testpuls gemessen. Die Stromantworten sind in Abb. 2.5B gezeigt. Aus den Stromextrema vor und nach Konditionierung wurden Verhältnisse gebildet und über der Konditionierungsspannung aufgetragen (Abb. 2.5C). Für typische Na_V -Kanäle kann an die Abfolge von Punkten eine Boltzmann-Funktion angepasst werden:

$$\frac{I_2}{I_1} = h_{max} \cdot (h_{max} - h_{min}) \cdot \frac{1}{(1 + e^{-\frac{V-V_h}{k_h}})} \quad (2.2)$$

mit der Inaktivierung als als Verhältnis der Stromminima Puls 2 zu Puls 1 $\frac{I_2}{I_1}$, den minimalen und maximalen Kanalverfügbarkeiten h_{min} sowie h_{max} , der Konditionierungsspannung V , der halbmaximalen Inaktivierungsspannung V_h und der Spannungsabhängigkeit der Gleichgewichtsinaktivierung k_h .

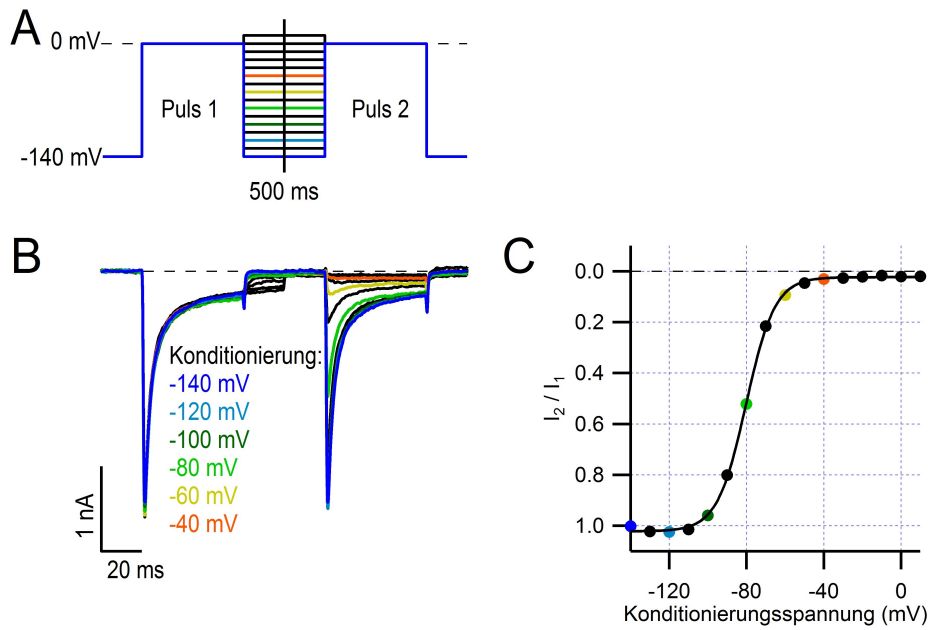


Abbildung 2.5: Die Gleichgewichtsinaktivierung wurde mit einem h_{∞} -Protokoll gemessen. **A** Typisches Pulsprotokoll für h_{∞} -Messungen ausgehend von einem Haltepotential von -140. Zwischen Puls 1 und Puls 2 erfolgen in 10 mV-Abständen 500 ms Konditionierungen bei -140 bis 10 mV. Zwischen jeder Depolarisation erhält die Zelle für 10 bis 20 s die Möglichkeit zur Erholung bei Haltepotential. **B** Stromantworten nach Membrandepolarisationen sind der Übersichtlichkeit wegen in verschiedenen Farben hervorgehoben und mit den Konditionierungsspannungen markiert. **C** Verhältnisse der Stromextrema jedes Pulses aufgetragen über der Spannung ergeben Boltzmann-Kurve mit Parametern halbmaximaler Inaktivierungsspannung V_h und Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung k_h . Der Wert h_{∞} entspricht dem Grenzwert, welchem sich $\frac{I_2}{I_1}$ bei stark depolarisierter Konditionierung annähert.

Substanzapplikation

Die zeitlich aufgelöste elektrophysiologische Untersuchung der Effekte von Substanzen auf Na_V -Kanäle wurde mithilfe des *Onrate*-Pulsprotokolls durchgeführt. Dabei wird der gleiche Testpuls dauerhaft wiederholt. Nach einer Kontrollphase, während welcher auf konstante Stromantworten geachtet wird, kann die Substanz (z. B. durch Badaustausch)

appliziert werden. In Abb. 2.6B ist die Inhibierung von $\text{Na}_V1.4$ durch STX mit zunehmender Zeit für eine Beispielzelle gezeigt. An die Stromextrema aufgetragen über der Zeit (Abb. 2.6C) wurde eine Exponentialfunktion angepasst:

$$I(t) = I_0 + I_1 \cdot (1 - e^{-\frac{t-t_0}{\tau_{on}}}) \quad (2.3)$$

mit dem Strom als Funktion der Zeit $I(t)$, dem Stromextremum vor Applikation I_0 , Effekt der Substanzapplikation auf die Stromamplitude I_0 , der Zeit t , dem Zeitpunkt der Substanzapplikation und der Zeitkonstante τ_{on} .

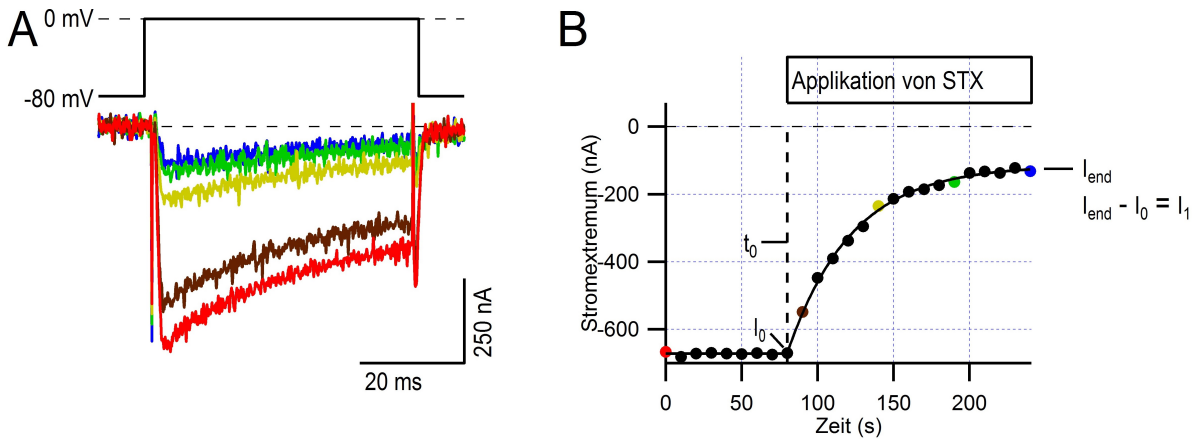


Abbildung 2.6: Die Effekte von Substanzen auf Na_V -Kanäle werden zeitaufgelöst mit einem *Onrate*-Pulsprotokoll durchgeführt. **A** Typisches Pulsprotokoll, bei welchem ein Testpuls ausgehend vom Haltepotential auf konstante Membranspannungen sehr oft wiederholt wird. Beispielstromspuren, wo anhand des STX-Effekts das Pulsprotokoll erläutert werden soll. Nach Überprüfung des Stromes in Abwesenheit der Substanz erfolgt die Applikation. Das bewirkt eine immer stärkere Einstrominhibierung. **B** Die Stromextrema sind über der Zeit aufgetragen. Die gefärbten Punkte repräsentieren die Stromextrema der ebenfalls gefärbten Stromspuren aus A.

Konzentrations-Wirkungsbeziehungen

Die Konzentrations-Wirkungsbeziehungen von Substanzen wurden durch Auftragen der Toxinwirkung (als Mittelwerte von n unabhängigen Experimenten) über Toxinkonzentration mit einer Anpassungsfunktion nach Hill aufgestellt:

$$p_{Block} = p_{min} + \frac{(p_{max} - p_{min})}{(1 + [\frac{IC_{50}}{C}]^h)} \quad (2.4)$$

mit der Strominhibierung p_{Block} , p_{max} als maximaler Effekt, p_{min} als minimaler Effekt, der IC_{50} als halbmaximaler effektiver Konzentration und dem Hillkoeffizient h .

Die Anpassungsfunktion wurde so verwendet, dass die obere Grenze als 1 und die untere Grenze als 0 definiert wurden, IC_{50} und h blieben flexibel. Es wurde allerdings darauf geachtet, dass h etwa 1 betrug.

Charakterisierung der Deaktivierung durch Aufnahme von Tailströmen

Zur Beschreibung der Spannungsabhängigkeit und Kinetik der Deaktivierung wurden Tailstrom-Protokolle aufgenommen (Abb. 2.7A). An die Tailströme (Abb. 2.7B) wurde diese Exponentialfunktion angepasst:

$$I(t) = I_0 + I_1 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{\text{deact}}}} \quad (2.5)$$

mit dem Strom als Funktion der Zeit $I(t)$, dem Minimum des Tailstroms I_0 , der Stromamplitude I_1 , der Zeit t und der Deaktivierungszeitkonstante τ_{deact} . Die Resultate sind in Abb. 2.7C über der Deaktivierungsspannung aufgetragen.

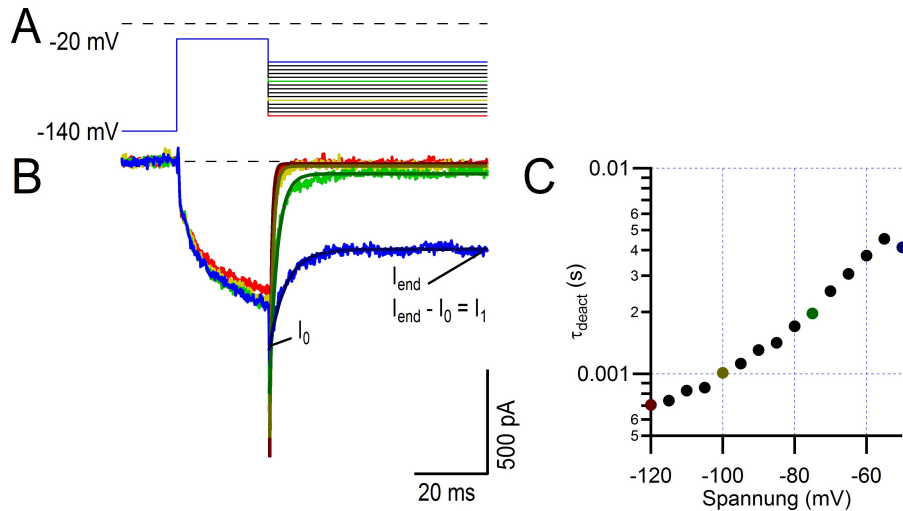


Abbildung 2.7: Zur Charakterisierung der Deaktivierung wurden die Tailströme gemessen. **A** Tailstrom-Protokoll ausgehend von einem Haltepotential von -140 mV auf -20 Testpuls und anschließender Konditionierung bei Spannungen von -120 bis -50 mV in 5 mV-Schritten. **B** Ausgewählte Stromspuren einer repräsentativen Messung inklusive Anpassungskurven. **C** Zeitkonstante der Deaktivierung τ_{deact} der Messung von B aufgetragen über der Deaktivierungsspannung.

2.4.2 Bestimmung der Inaktivierungszeitkonstante τ_h

Die Kinetik der schnellen Inaktivierung folgt einer exponentiellen Abhängigkeit und lässt sich durch folgende Anpassungsfunktion beschreiben:

$$I(t) = I_0 + I_1 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_h}} \quad (2.6)$$

mit dem Strom als Funktion der Zeit $I(t)$, dem Stromextremum I_0 , der Stromamplitude I_1 , der Zeit t und der Inaktivierungszeitkonstante τ_h .

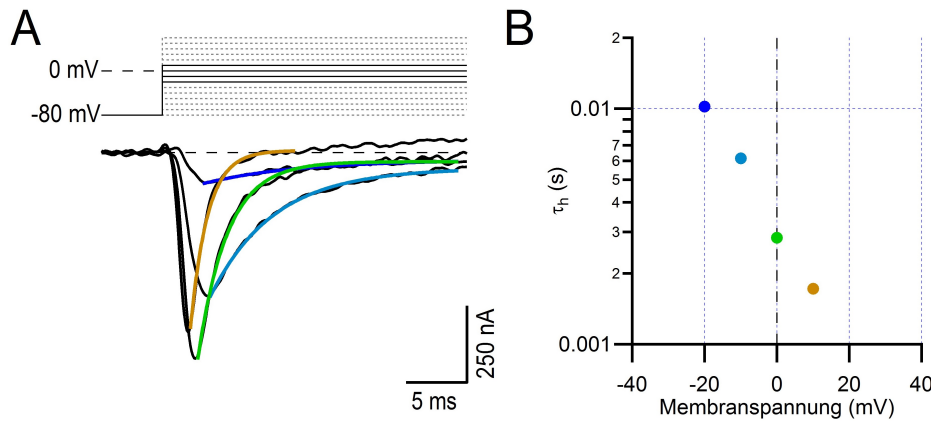


Abbildung 2.8: Die Bestimmung der Inaktivierungszeitkonstante τ_h erfolgte mithilfe von Gleichung 2.6. **A** Stromantworten der $I(V)$ -Messungen von -20-10 mV einer TEVC-Messung der Chimäre 4444_C9 mit Anpassungskurven beginnend beim Stromextremum. Für die Auswertung nicht berücksichtigte Depolarisationen sind als gepunktete Linien dargestellt. **B** Resultate für τ_h der in A gezeigten Stromspuren.

2.4.3 Korrektur des Diffusionspotentials

Sofern nicht anders angegeben wurden die angezeigten Spannungen der Patch-Clamp-Messungen nicht um das *liquid junction potential* (Diffusionspotential) korrigiert. Die Werte für die verwendeten Lösungskombinationen können in Tabelle 2.6 nachgelesen werden. Eine Unterscheidung hinsichtlich der Lösungszusätze wurde nicht vorgenommen. Alle Spannungen müssen um die entsprechenden Werte ihres Lösungspaares durch Addition korrigiert werden.

Tabelle 2.6: Gemessenes Diffusionspotential für die jeweiligen Lösungskombinationen

| Badlösung | Pipettenlösung | Diffusionspotential (mV) |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|
| Standardbadlösung | Standardpipettenlösung 1 | -8 |
| Standardbadlösung | Internlösung IL1 | -4 |
| Standardbadlösung | Internlösung IL2 | -4 |
| Standardbadlösung | Standardpipettenlösung 2 | -4 |

2.4.4 Software

Es wurden die MS Office-Produkte Word, Excel und Powerpoint in den Versionen 2007 und 2010 verwendet. Die Planung und Kontrolle von molekularbiologischen Arbeiten erfolgte mithilfe von Vector NTI 11 (Life Technologies), Vergleiche der Aminosäuresequenz wurden mit AlignX durchgeführt.

Die Steuerung des Sequenzierers Licor 4300 erfolgte durch die mitgelieferte Software eSeq. Für die Aufnahme von Patch-Clamp- oder Zweielektroden-Spannungsklemme-Messungen wurde PATCHMASTER (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Deutschland) sowie zur Auswertung der Messdaten FITMASTER (HEKA) bzw. Igor Pro Version 6.34A (Wavemetrics, Lake Oswego, USA) verwendet. Die Manipulation der Röntgenkristall-Strukturen erfolgte mithilfe der in die PDB-Datenbank (www.pdb.org) integrierten JMol-Funktion. Die Abbildungen wurden mit Igor Pro, Inkscape Version 0.48 (Free Software Foundation Inc, Boston, USA) und Paint.NET Version 3.5.11 (www.getpaint.net) erstellt.

2.4.5 Elektronische Messwertverarbeitung und Statistik

Die Aufnahmerate betrug bei TEVC-Messungen 10 kHz und bei Patch-Clamp-Messungen 25 kHz für I(V)-, *Onrate*- und h_{∞} -Messungen bzw. 50 kHz für Tailstrom-Messungen. Für die meisten Experimente wurden Leckströme und kapazitive Artefakte durch 4 oder 6 p/n-Pulse automatisch während der Messungen subtrahiert. Bei den I(V)-Resultaten mussten die Stromspuren von Hand um kapazitive und Leckströme berichtigt werden. Dazu wurden zwei zusätzliche Spannungspulse auf -120 und -110 mV (bei -130 mV Haltepotential) bzw. auf -120 und -160 mV (bei -140 mV Haltepotential) pro Stromspur aufgenommen. Die Stromspuren wurden für die Auswertung bei 3 kHz digital Tiefpass Bessel-gefiltert und entweder direkt mit FITMASTER ausgewertet oder exportiert und anschließend mit Igor Pro ausgewertet.

Die gewonnenen Messwerte von mindestens 3 unabhängigen Experimenten wurden als arithmetische Mittel \pm Standardfehler des Mittelwerts dargestellt. Die Parameter der Anpassungsfunktionen von Einzelmessungen wurden auch als arithmetische Mittel \pm Standardfehler des Mittelwerts betrachtet. Zum Vergleich von Datengruppen untereinander wurden zweiseitige ungepaarte t-Tests durchgeführt. Bei einer Wahrscheinlichkeit von

$P < 0.05$ für das Eintreten der Nullhypothese wurden Datengruppen als signifikant verschieden definiert. Die grafische Abbildung der t-Test-Ergebnisse wurde wie folgt durchgeführt: $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) und $P < 0.001$ (***).

3 Ergebnisse

3.1 Na_V-Kanäle untersucht in *Xenopus*-Oozyten

3.1.1 Funktionelle Expression von Wildtypkanälen

Das erste Experiment bestand darin zu untersuchen, ob hNa_V1.9-Kanäle in *Xenopus*-Oozyten heterolog exprimiert werden können. Dazu wurden hNa_V1.9 sowie rNa_V1.4, hNa_V1.7 und hNa_V1.8 zur Kontrolle in *Xenopus*-Oozyten exprimiert (siehe Abschnitt 2.2.5) und für bis zu sieben Tage inkubiert.

In *Xenopus*-Oozyten wurde die erfahrungsgemäß maximal mögliche mRNA-Menge von hNa_V1.9 injiziert [109]. Die mithilfe von 50 ms andauernden Membrandepolarisationen ausgehend von einem Haltepotential bei -80 mV auf -80 bis 60 mV gewonnenen Stromspuren zeigten auch nach 7 Tagen Inkubationsdauer in 100 gemessenen Oozyten keine typischen Stromantworten (Abb. 3.1A). In einigen Zellen konnten kleine, schnell inaktivierende, endogene Stromantworten mit Amplituden bis zu -75 nA und langsame, nichtinaktivierende, endogene Auswärtsströme detektiert werden. Aus den Stromextrema aller Messungen bei 0 mV wurde ein Durchschnitt von 33 ± 7 nA bestimmt; dieser ist auch in Abb. 3.1F aufgetragen. Da nur wenige Oozyten eine Woche gelagert werden konnten und ihre Eignung für elektrophysiologische Experimente mit zunehmender Inkubationsdauer immer weiter abnahm, wurde die Inkubationszeit nicht auf über 7 Tage ausgeweitet.

Zur Kontrolle wurden *Xenopus*-Oozyten mit rNa_V1.4 injiziert. Diese zeigten bereits am Tag nach der Injektion eine funktionelle Kanalexpression, welche teilweise zu unkontrollierbar großen Na⁺-Strömen führte. Die Oozyten reagierten dabei reproduzierbar auf Depolarisation mit Stromantworten von mindestens 500 nA maximaler Einstromamplitude. In Abb. 3.1B ist eine repräsentative TEVC-Messung mit rNa_V1.4-Strom gezeigt. Die von *Xenopus*-Oozyten abgeleiteten Stromantworten zeigten eine rasche Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik. Der Maximaleinstrom war innerhalb von 1-2 ms erreicht und die vollständige Depolarisationsantwort der Kanäle in der Membran dauerte insgesamt nur etwa 10 ms. Aus den Stromextrema aller Messungen bei 0 mV wurde ein Durchschnitt von -3.3 ± 0.4 μ A bestimmt (n=19, Abb. 3.1F).

Ein analoges Vorgehen erbrachte auch für *Xenopus*-Oozyten injiziert mit hNa_V1.7-mRNA über Nacht eine funktionelle Expression mit reproduzierbaren Stromantworten. In Abb. 3.1C sind Stromspuren einer repräsentativen Messung gezeigt, welche von der Kinetik des Aktivierungs- und Inaktivierungsprozesses her mit rNa_V1.4 vergleichbar sind.

Für die Stromextrema bei 0 mV ergab sich ein Durchschnitt von $-1.5 \pm 0.2 \mu\text{A}$ ($n=32$, Abb. 3.1F).

Für den schlechter in *Xenopus*-Oozyten zu exprimierenden hNa_V1.8-Kanal ließen sich erst nach drei Tagen reproduzierbar Stromantworten detektieren. Anhand der in Abb. 3.1D gezeigten Stromspuren einer repräsentativen Messung wird deutlich, dass sich die Kanalaktivierung auch innerhalb von 2 ms vollzog. Anders als bei rNa_V1.4 und hNa_V1.7 war die Inaktivierung langsamer und es verblieb eine persistierende Stromkomponente. Da die Kanalaktivierung von hNa_V1.8 in den depolarisierten Spannungsbereich verschoben ist, wurden die Stromextrema bei 20 mV für die Berechnung des durchschnittlichen Maximaleinstoms verwendet. Da ergab sich ein Wert von $-617 \pm 54 \text{ nA}$ ($n=33$, Abb. 3.1F).

Die ebenfalls als Kontrolle verwendeten nicht injizierten Oozyten zeigten keine Na_V-Kanal-typischen Stromantworten (Abb. 3.1E). Für die Stromextrema bei 0 mV ergab sich ein Durchschnitt von $16 \pm 0.2 \text{ nA}$ ($n=25$, Abb. 3.1F).

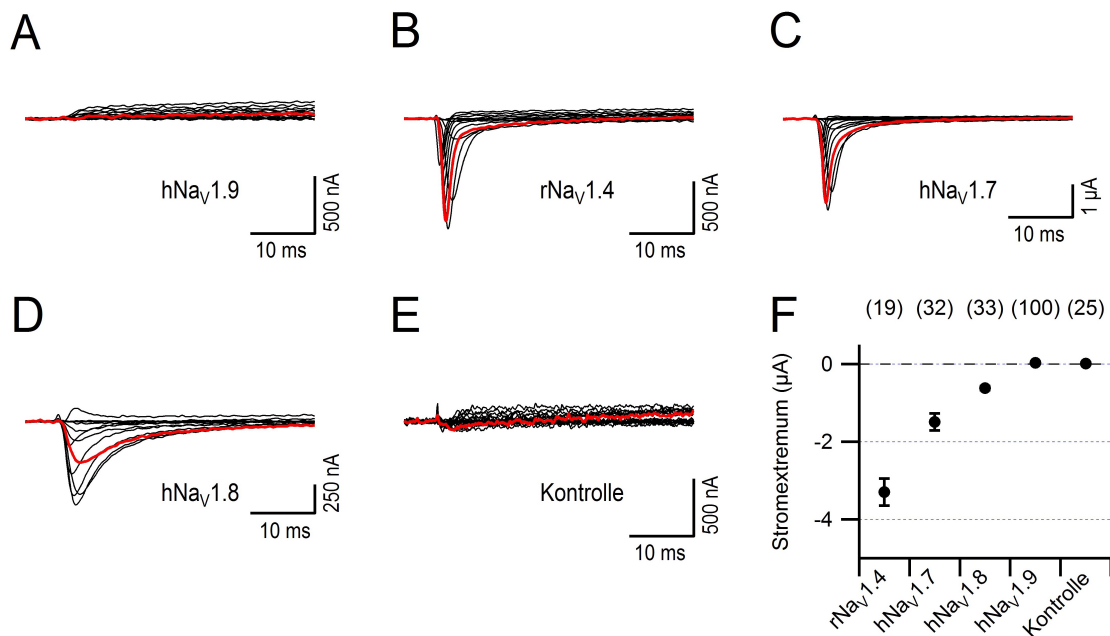


Abbildung 3.1: *Xenopus*-Oozyten sind nicht als Expressionssystem für die Expression von hNa_V1.9 geeignet. **A** Stromantworten repräsentativer TEVC-Messung einer Oozyten injiziert mit hNa_V1.9 zeigte keine typischen Na⁺-Ströme. Die Depolarisationen erfolgten ausgehend von -80 mV Haltepotential in 10 mV-Schritten auf -80 bis 60 mV. 0 mV-Stromspur ist rot hervorgehoben. **B-E** Analog zu A durchgeführte Messung von rNa_V1.4 (B), hNa_V1.7 (C), hNa_V1.8-Ströme (D) und einer nichtinjizierten Oozyte (E). **F** Durchschnittswerte der Stromextrema bei 0 mV von Kontrollzellen, hNa_V1.9, hNa_V1.7 und rNa_V1.4 sowie bei 20 mV von hNa_V1.8.

Es konnte gezeigt werden, dass hNa_V1.9 in *Xenopus*-Oozyten nicht funktionell exprimiert werden konnte, obwohl diese Zellen für die heterologe Expression von verschiedenen spannungsgesteuerten Natriumkanälen prinzipiell geeignet waren und längere Inkubati-

onszeiten sowie mehr mRNA als bei den Kontrollen verwendet wurde.

3.1.2 Expression von Domänen aus hNa_v1.9 in rNa_v1.4

Das Problem mit der funktionellen Expression von Na_v1.9 in *Xenopus*-Oozyten erforderte eine andere Herangehensweise, um wenigstens Teile des Kanals funktionell untersuchen zu können. Daher wurden in Abschnitt 2.2.2 beschriebene Kanalchimären (Abb. 3.2) analog zu den Wildtypkanälen exprimiert.

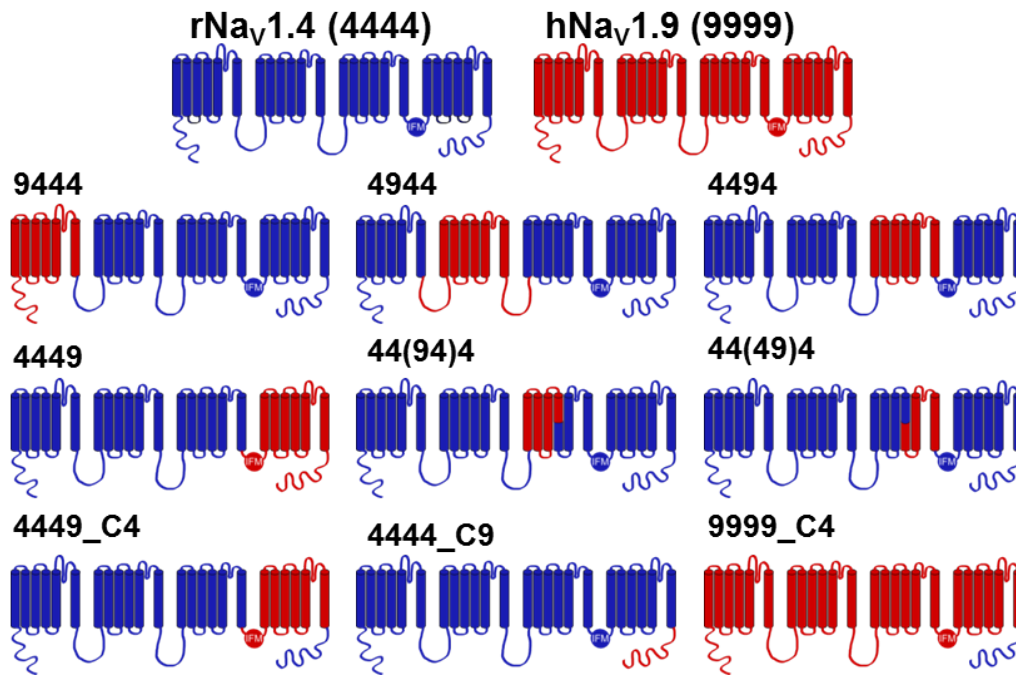


Abbildung 3.2: Kanalchimären von hNa_v1.9 im rNa_v1.4-Hintergrund. 9444 N-Terminus und DI. 4944 DII/DIII-Linker sowie DII und DII/DIII-Linker. 4494 S1-S6 von DIII. 4449 DIII/DIV-Linker sowie DIV und C-Terminus. 44(94)4 S1-S4 von DIII. 44(49)4 S4-S6 von DIII. 4449_C4 DIII/DIV-Linker und DIV. 4444_C9 C-Terminus. 9999_C4 C-Terminus von rNa_v1.4 im Hintergrund von hNa_v1.9.

In Abb. 3.3, Abb. 3.4 und Abb. 3.5 sind repräsentative I(V)-Messungen als Stromspuren und dazugehörige Strom-Spannungskennlinie für jede Chimäre gezeigt. Die Anpassungsfunktionen wurden durch Verwendung der Gleichung 2.1 erstellt. Die Stromspur bei 0 mV und das Stromextremum bei 0 mV sind in Abb. 3.3 und Abb. 3.4 jeweils rot markiert. Grau unterlegte Messpunkte wurden nicht in die Anpassungen einbezogen wegen Überlagerung mit Leckströmen oder Stromextrema bei ungeklebten Membranspannungen.

Zunächst wurden die Kanalchimären mit vollständiger 4444- bzw. 9999-Pore mit den entsprechenden Wildtypen verglichen. Auch wenn für 9999 keine funktionelle Expression festgestellt werden konnte, ist in Abb. 3.3A eine repräsentative Messung aufgeführt. In

Abb. 3.3B sind außerdem noch Stromspuren und Strom-Spannungskennlinie von 4444 abgebildet. Die Messwerte betragen für die halbmaximale Aktivierungsspannung der Schaltstellen $V_m -32.7 \pm 1.2$ mV und für die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung $k_m 4.5 \pm 0.5$ mV ($n=8$).

Die Chimäre 9999_C4 (Abb. 3.3C) ist das Konstrukt, welches den größten hNav1.9-Anteil hat und messbare Stromantworten zeigt. Bereits ab -70 mV sind Na^+ -Ströme sichtbar, die bei -10 mV das Einstrommaximum erreichen. Auffällig ist, dass der Inaktivierungsprozess der Kanäle langsamer als bei allen anderen Chimären abläuft und dass ein großer Anteil des Stroms persistierend ist. Während V_m mit -31.7 ± 1.2 mV sich von 4444 nicht signifikant unterscheidet, ist k_m mit 24.9 ± 1.0 mV ($n=16$) mehr als fünfmal so groß wie bei 4444. Damit hat 9999_C4 die schwächste Spannungsabhängigkeit aller Chimären.

Die Chimäre 4444_C9 (Abb. 3.3D) ist ein schnell aktivierender und inaktivierender Nav-Kanal mit sichtbaren Stromantworten ab -30 mV. Das Einstrommaximum wird bei 0 mV erreicht. Die Auswertung ergab für $V_m -19.7 \pm 0.4$ mV und für $k_m 5.3 \pm 0.1$ mV ($n=14$). Ein Austausch des C-Terminus bewirkt also eine Verschiebung von V_m um mehr als 10 mV in den depolarisierten Spannungsbereich, während sich k_m dagegen nicht signifikant ändert.

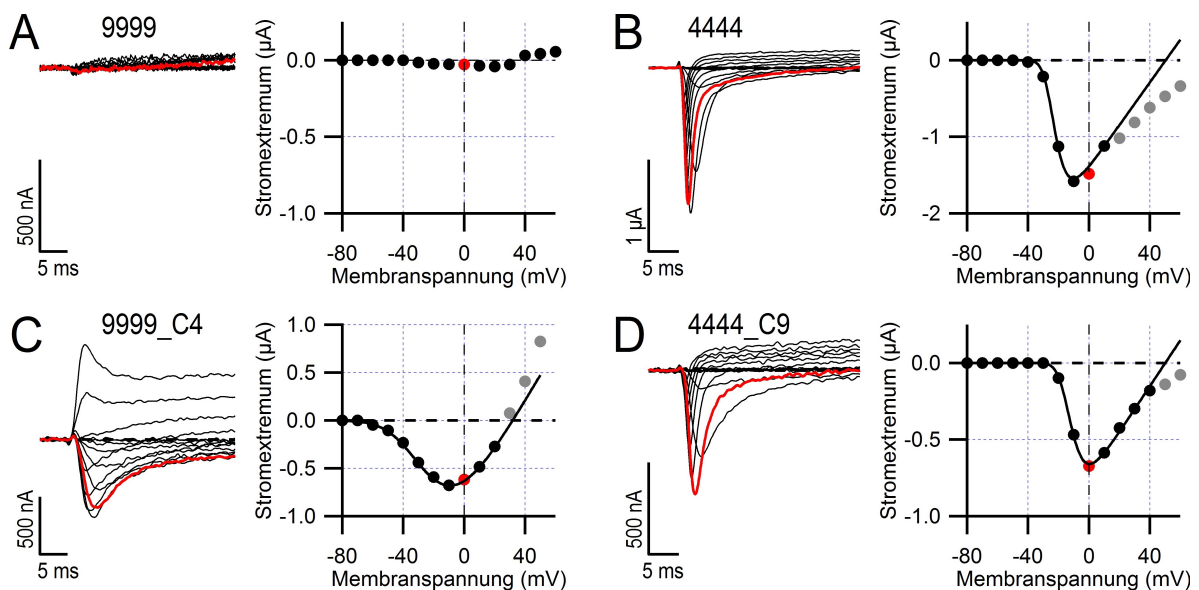


Abbildung 3.3: Kanalchimären von 9999-Domänen im 4444-Hintergrund ermöglichen Expression in *Xenopus*-Oozyten (Teil 1). **A-D** Repräsentative Messungen mit Nav-typischen Stromspuren (links) als Antworten auf 50 ms Depolarisationen auf -80 bis 60 mV. Die Strom-Spannungskennlinie angepasst an Stromextrema aufgetragen über der Membranspannung. Aufgeführt sind 9999 (A), 4444 (B), 9999_C4 (C) und 4444_C9 (D). Grau unterlegte Punkte waren in die Anpassung nicht mit einbezogen.

So konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus eine essentielle Rolle bei der funktionellen Expression von $\text{Na}_V1.9$ spielt. Es scheint sich dabei so zu verhalten, dass man den C-Terminus des nicht exprimierenden $\text{hNa}_V1.9$ durch den des gut exprimierenden $\text{rNa}_V1.4$ austauschen kann und Stromantworten durch Depolarisation der Membran auslösen kann. Im Gegenzug sorgt ein Austausch des C-Terminus bei $\text{rNa}_V1.4$ nicht für Verhinderung der funktionellen Expression von 4444_C9. Darüber hinaus bewirkt der ausgetauschte C-Terminus Veränderungen des Schaltverhaltens der Kanäle.

Die Chimäre 9444 (Abb. 3.4A) zeigt eine sehr schnelle Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik. Stromantworten sind wie bei 4444 ab -40 mV detektierbar, der maximale Einwärtsstrom wird jedoch erst bei 10 mV erreicht. Die Werte für V_m mit 19.5 ± 1.3 mV und k_m mit 14.4 ± 1.2 mV ($n=5$) sind jeweils signifikant verschieden von 4444 ($P<0.001$).

Für die Chimäre 4944 (Abb. 3.4B) zeigt sich auch ein Na_V -kanaltypisches Verhalten mit schnellem Aktivierungs- und Inaktivierungsvorgang. Bei keiner gemessenen Zelle konnten Einwärtsströme größer als -150 nA festgestellt werden, allerdings konnten untypisch große Auswärtsströme bei 60 mV detektiert werden. Die Kanalaktivierung ist stark in den depolarisierten Spannungsbereich verschoben. Im Gegensatz zu 4444 werden Stromveränderungen erst ab -10 mV sichtbar und der maximale Einstrom wird bei 30 mV erreicht. Der Wert für V_m ist mit 17.1 ± 1.1 mV signifikant in den depolarisierten Spannungsbereich verschoben und k_m ist mit 19.1 ± 1 mV ($n=11$) ebenfalls signifikant größer als bei 4444 ($P<0.001$).

Die Chimäre 4494 (Abb. 3.4C) zeigte bei mehreren Oozyteninjektionen mit 2:1 verdünnter mRNA auch nach 7 Tagen Inkubationsdauer in 62 gemessenen *Xenopus*-Oozyten keine Stromantworten, welche sich von endogenen Strömen unterscheiden ließen.

Die Kanäle der Chimäre 4449 (Abb. 3.4D) zeigen eine typische schnelle Kanalaktivierung und -inaktivierung. Die Stromsignale von 4449 waren ab -40 mV detektierbar, das Einstrommaximum wird bei der gezeigten Zelle wie für 4444 bei -10 mV erreicht. Mit V_m -Werten von -21.3 ± 0.3 mV und k_m von 7.1 ± 0.2 mV ($n=9$) unterscheiden sich die Werte jedoch signifikant von 4444 ($P<0.001$). Es wird außerdem deutlich, dass ein Teil des 4449-Stroms persistiert.

Die Stromantworten der Chimäre 4449_C4 (Abb. 3.4E) besitzen die für Na_V -Kanäle typische schnelle Aktivierung sowie Inaktivierung. Ein sichtbarer Einwärtsstrom beginnt ab -50 mV und der maximale Einstrom wird bei -10 mV erreicht. Für V_m wird im Mittel ein Wert von -33 ± 0.6 mV und für k_m von 8 ± 0.4 mV ($n=13$) erreicht. Der V_m -Wert unterscheidet sich nicht signifikant von 4444, der k_m -Wert ist jedoch signifikant größer als bei 4444 ($P<0.001$).

Nur die *Xenopus*-Oozyten injiziert mit den Kanalchimären 4449_C4 und 4444_C9 zeigten näherungsweise mit 4444 vergleichbare Stromamplituden nach Inkubation über Nacht. Von allen anderen exprimierten Chimären konnten erst nach mindestens sechs Tagen Inkubationsdauer in einigen Oozyten gut messbare Na^+ -Ströme abgeleitet werden.

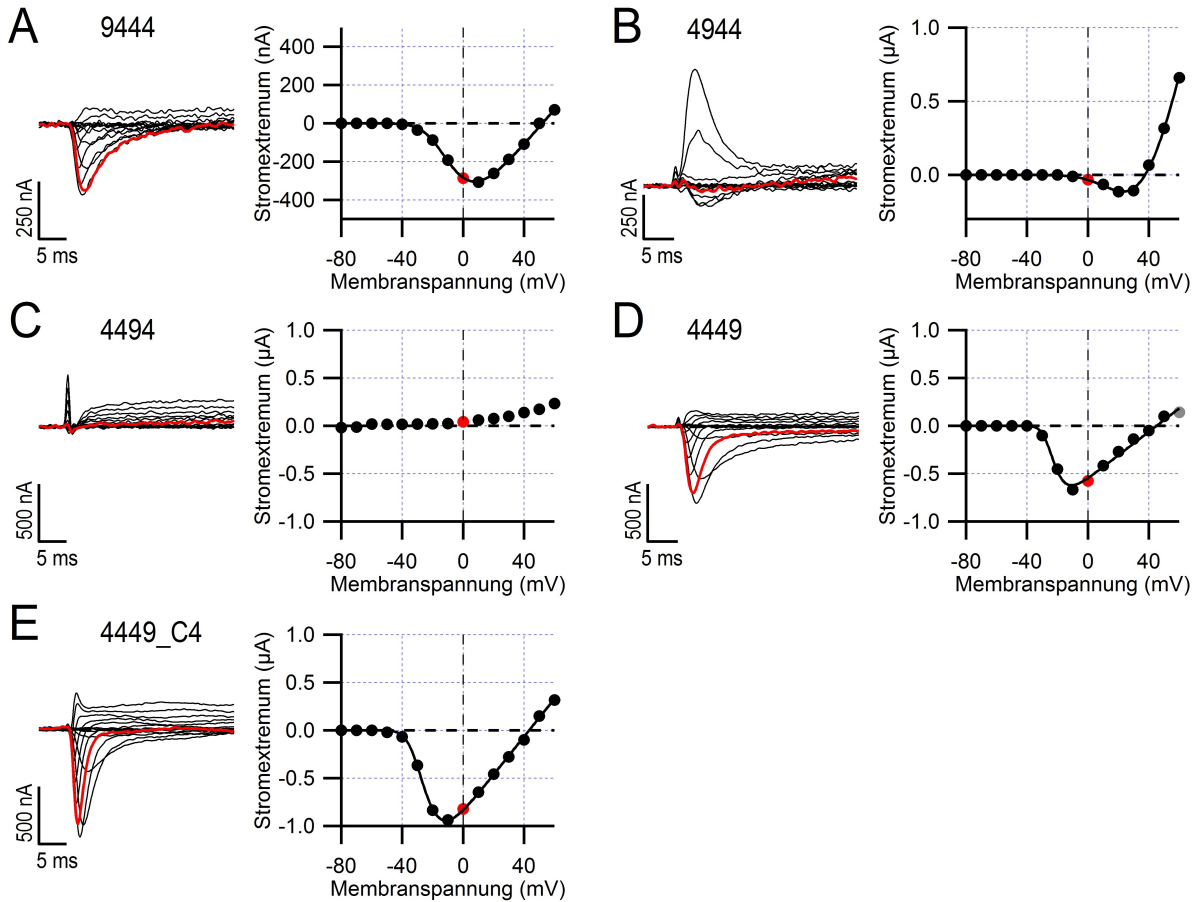


Abbildung 3.4: Kanalchimären von 9999-Domänen im 4444-Hintergrund ermöglichen Expression in *Xenopus*-Oozyten (Teil 2). **A-E** Repräsentative I(V)-Messungen mit Na_V -typischen Stromspuren (links) als Antworten auf 50 ms Depolarisationen auf -80 bis 60 mV. Die Strom-Spannungskennlinie (nach Gleichung 2.1) wurde an die Stromextrema der jeweiligen Stromspuren aufgetragen über der Membranspannung angepasst. Aufgeführt sind 9444 (A), 4944 (B), 4494 (C), 4449 (D) und 4449_C4 (E).

Die Kanalchimäre 4494 zeigte keine funktionelle Expression in *Xenopus*-Oozyten. Für eine genauere Bestimmung der Ursachen wurde DIII noch einmal geteilt (siehe Abschnitt 2.1) und als Chimären 44(94)4 und 44(49)4 exprimiert.

Die Chimäre 44(94)4 zeigte bereits nach Inkubation über Nacht eine deutliche funktionelle Expression mit reproduzierbaren Stromantworten (Abb. 3.5A). Die Strom-Spannungskennlinien ergaben im Mittel Werte für V_m mit -41.2 ± 1 mV und für k_m mit 6.3 ± 0.5 mV ($n=6$). Damit ist V_m im Vergleich zu 4444 signifikant um 10 mV in den hyperpolarisierten Spannungsbereich verschoben. Die Werte für k_m unterscheiden sich zwar auch signifikant von 4444, aber aufgrund der Messungenauigkeit der TEVC-Methode sollten kleine Unterschiede von ca. 2 mV vernachlässigt werden.

Die Chimäre 44(49)4 zeigte in 52 gemessenen Zellen aus drei Oozyteninjektionen auch

nach 7 Tagen Inkubation keine funktionelle Expression (Abb. 3.5B). Daran wird deutlich, dass die hintere Hälfte von DIII im rNav1.4-Hintergrund die funktionelle Expression verhindert.

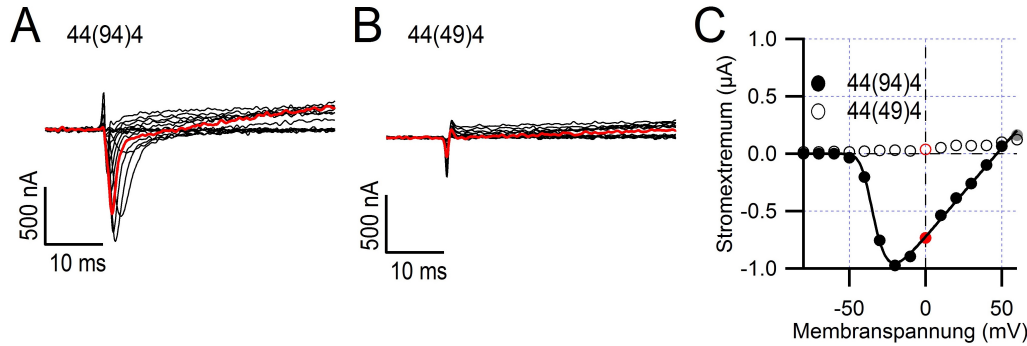


Abbildung 3.5: Die zweite Hälfte von DIII behindert die funktionelle Expression der Chimäre 4494 in *Xenopus*-Oozyten. **A** Stromspuren einer repräsentativen TEVC-Messung von 44(94)4. **B** Für 44(49)4 waren nach einer Woche keine Na^+ -Ströme messbar. **C** Stromextrema von 44(94)4 (gefüllte Kreise) und von 44(49)4 (offene Kreise) aufgetragen über der Membranspannung. Für 44(94)4 ist auch die Strom-Spannungskennlinie gezeigt.

In Abb. 3.6 sind die Ergebnisse der I(V)-Messungen für die Werte V_m (A), k_m (B) und E_{rev} (C) zusammengefasst. Die V_m -Werte von zwei Chimären unterscheiden sich nicht signifikant von 4444: 9999_C4 und 4449_C4. Drei Chimären (9444, 4449 und 4444_C9) weisen Werte um -20 mV auf und die Chimäre 4944 fast 20 mV. Lediglich V_m der Chimäre 44(94)4 ist im Vergleich zu 4444 in den hyperpolarisierten Spannungsbereich bei -40 mV verschoben.

Von den k_m -Werten unterscheidet sich nur 4444_C9 nicht signifikant von 4444. Für die meisten Chimären (44(94)4, 4449, 4449_C4) beträgt k_m zwischen 5 und 10 mV. Für 9444, 4944 und 9999_C4 ist k_m mit Werten von ca. 15 bis 25 mV um das Drei- bis Vierfache höher als für 4444.

Mit Ausnahme von 9999_C4 betragen die Werte für das Umkehrpotential E_{rev} zwischen 40 und 50 mV. Das deutet auf eine ungefähr vergleichbare Selektivität hin, wie es für typische Na_V -Kanäle der Fall ist. Es ist zu beachten, dass E_{rev} in vielen Fällen nicht genau bestimmt werden konnte. Ursache dafür ist einerseits die Überlagerung mit Endogenströmen und andererseits eine zu geringe Klemmggeschwindigkeit. Die starke Abweichung von E_{rev} für 9999_C4 deutet auf eine höhere intrazelluläre Na^+ -Konzentration hin, welche durch die unvollständige Inaktivierung von dieser Chimäre ausgelöst werden könnte.

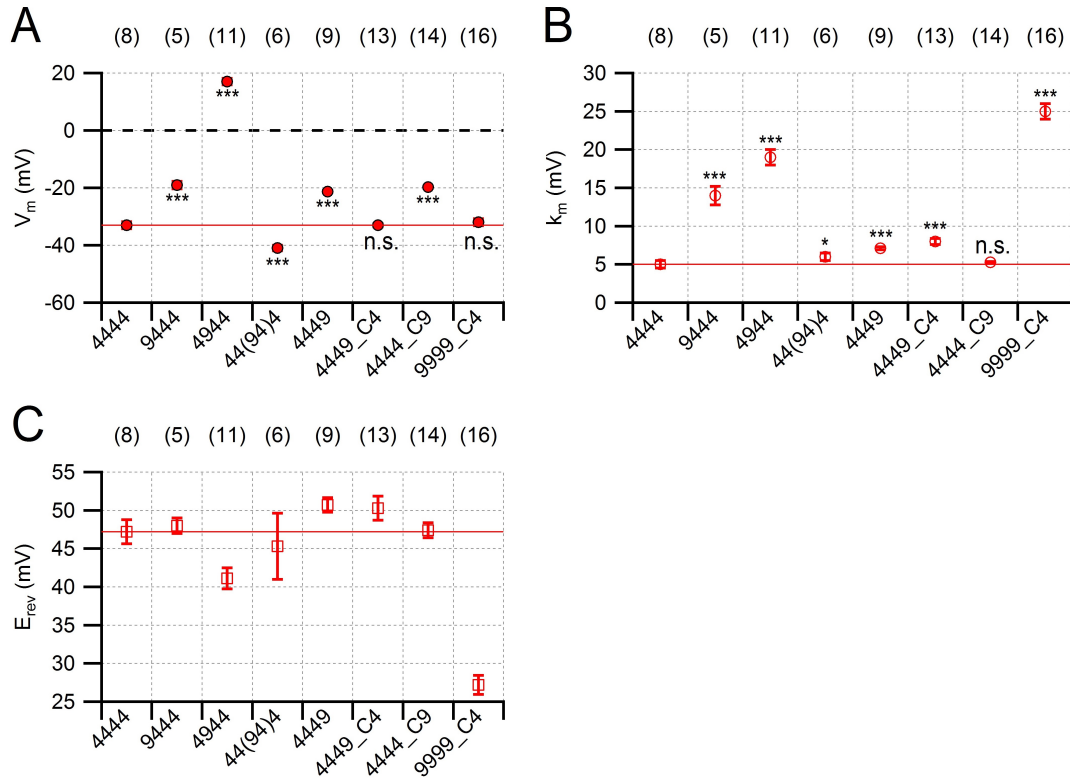


Abbildung 3.6: Zusammenfassung der Werte V_m , k_m und E_{rev} der Kanalchimären. **A-C** Werte für V_m (A), für k_m (B) und für E_{rev} (C). Die rote Linie markiert die Resultate für Kontrollmessungen mit 4444. Der Vergleich Chimäre gegen 4444 wurde auf statistische Signifikanz mittels t-Test überprüft.

3.1.3 hNav β 1 vergrößert Stromamplitude von 9999_C4

Die persistierenden Na^+ -Ströme in DRG-Neuronen stehen im Zusammenhang mit der Proteininteraktion von Na_V -Kanälen mit der Untereinheit $\text{Na}_V\beta 3$ [11], welche auch die ER-Retention des Kanals $\text{Na}_V 1.8$ verringert [64]. Für den Versuch, die funktionelle Expression zu verbessern, wurde die Chimäre 9999_C4 mit den Untereinheiten hNav β 1, $\text{Na}_V\beta 3$ sowie ohne β -Untereinheit exprimiert. Die funktionelle Expression wurde mithilfe von I(V)-Messungen drei und sechs Tage nach mRNA-Injektion quantifiziert (Abb. 3.7). Drei Tage nach Injektion konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Kombinationen festgestellt werden ($n=6$, $P>0.05$). Sechs Tage nach Injektion wurde bei 10 mV eine signifikant erhöhte Stromamplitude für Oozyten injiziert mit 9999_C4 und hNav β 1 festgestellt ($n=6$, $P<0.001$). Zwischen der Kombination 9999_C4 und hNav $\beta 3$ sowie 9999_C4 ohne β -Untereinheit wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt.

Dieses Experiment ist ein Indiz dafür, dass die Untereinheit hNav β 1 die funktionelle Expression von hNav1.9-Kanalchimären in *Xenopus*-Oozyten unterstützt.

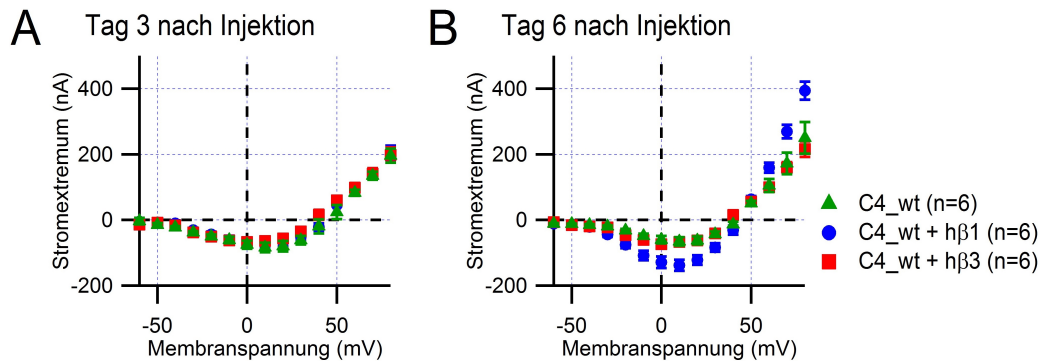


Abbildung 3.7: Die Koinjektion von hNav β 1 vergrößert Stromamplitude von 9999_C4 in *Xenopus*-Oozyten. **A** Strommittelwerte von I(V)-Messungen drei Tage nach Injektion von 9999_C4 alleine (rot) sowie koexprimiert mit hNav β 1 (blau), hNav β 3 (rot). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Datenpunkten festgestellt. **B** Sechs Tage nach Injektion war die Stromamplitude bei 10 mV für 9999_C4 koexprimiert mit hNav β 1 signifikant erhöht im Vergleich zu den anderen beiden Kombinationen ($P < 0.001$).

3.1.4 Untersuchung der schnellen Inaktivierung

Die Anstiegszeit der Membranspannung von *Xenopus*-Oozyten untersucht mit TEVC betrug ca. 1 ms. Das ist jeweils für 4449_C4 (Abb. 3.8A) und 4444 (Abb. 3.8B) gezeigt. Es fällt auf, dass der Aktivierungsprozess der Kanäle zum Teil im Bereich des Spannungsanstiegs zu Beginn des Pulses liegt und zum Teil vom unkompensierten, kapazitiven Strom verfälscht wurde. Deswegen wurde keine Anpassung nach dem Hodgkin-Huxley-Formalismus durchgeführt.

Beginnend ab dem Spitzenstrom wurde die Stromabnahme bis zur Nulllinie oder bis zum Erreichen eines persistierenden Stroms mithilfe von Exponentialfunktionen (siehe Gleichung 2.6) quantifiziert, um die Inaktivierungszeitkonstante τ_h zu bestimmen. Dieses Vorgehen wurde für alle Spannungen gewählt, wo eine deutliche Kanalinaktivierung innerhalb des 50 ms-Depolarisationspulses beobachtet werden konnte.

In Abb. 3.8C wird deutlich, dass für die Darstellung von τ_h ein Spannungsbereich von 80 mV betrachtet werden muss (-40 bis 40 mV). Wenngleich für jede Kanalchimäre bis zu 6 Depolarisationsspannungen auswertbar gewesen sind, unterschieden sich die halbmaximalen Aktivierungsspannungen V_m um fast 60 mV (siehe Abschnitt 3.1.2). Um die Klemmggeschwindigkeit zu berücksichtigen wurden 2 ms als unterste Grenze für mögliche Inaktivierungszeitkonstanten definiert.

Es wurde erwartet, dass τ_h für Nav-Kanäle mit steigender Membranspannung sinkt, da die Inaktivierungskinetik der Kanäle schneller wird. Das konnte für die meisten Chimären gemessen werden. Lediglich bei den Chimären 9999_C4 und 9444 ist jedoch so gut wie keine Verringerung der τ_h -Werte mit steigenden Membranspannungen zu beobach-

ten gewesen. Aufgrund der geringen Zeitaufösung der TEVC-Methode sind jedoch nur qualitative Aussagen möglich.

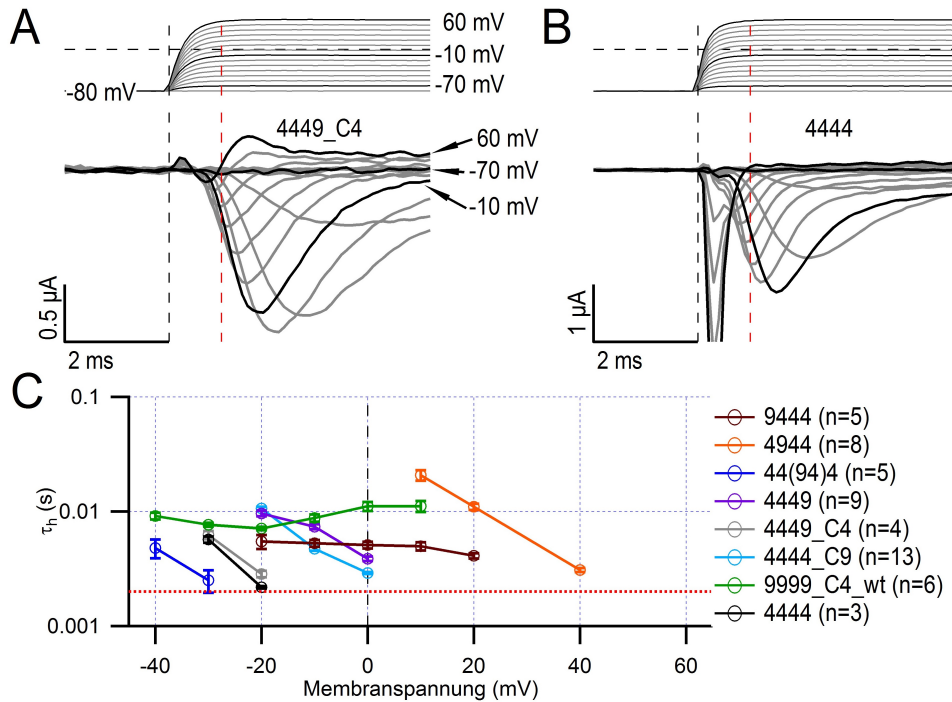


Abbildung 3.8: Inaktivierungszeitkonstanten τ_h der Kanalchimären verglichen mit 4444. **A** Spannungs- (oben) und Stromspuren (unten) von 4449_C4. Vertikale schwarze Linie markiert Beginn des Depolarisationspulses und rote Linie markiert Zeitpunkt 1 ms später. Schwarz hervorgehoben sind Strom und Membranspannungen bei -70, -10 und 60 mV. **B** Darstellung für 4444 analog zu A. **C** Aufgeführt sind die τ_h -Werte der Chimären 9444 (braun), 4944 (orange), 44(94)4 (dunkelblau), 4449 (violett), 4449_C4 (grau), 4444_C9 (türkis), 9999_C4 (grün) und 4444 (schwarz).

Die Kanalverfügbarkeit im Gleichgewicht wurde untersucht, um die Parameter halb-maximale Inaktivierungsspannung V_h und die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung k_h für die Chimären zu bestimmen. In Abb. 3.9 und Abb. 3.10 sind repräsentative h_∞ -Messungen in Form von Stromspuren und dazugehöriger Boltzmann-Anpassung für jede Chimäre gezeigt. Die Anpassungsfunktionen wurden durch Verwendung der Gleichung 2.2 erstellt, wobei die Kanalverfügbarkeiten als Verhältnis aus konditionierter Stromantwort (Testpuls 2) zu unkonditionierter Stromantwort (Testpuls 1) über der Konditionierungsspannung aufgetragen wurden. Die Stromspur mit -120 mV Konditionierungsspannung ist in grün und mit -40 mV Konditionierungsspannung in rot in Abb. 3.10 hervorgehoben.

Für die Kontrollmessungen mit 4444 (Abb. 3.9A) zeigt sich, dass die Konditionierung der Kanäle mit 500 ms-Spannungspulsen ab -70 mV zu einer Verringerung des Anteils aktivierbarer Kanäle führte. Innerhalb eines Spannungsintervalls von 50 mV gehen die

Kanäle vollständig in den inaktivierten Zustand über. Es ergeben sich für V_h -49.4 ± 0.5 mV und für k_h 4.8 ± 0.04 mV ($n=19$).

Die Kanäle der Chimäre 4444_C9 (Abb. 3.9B) reagieren erst auf stärker depolarisierte Konditionierungsspannungen ab -50 mV mit dem Übergang in den inaktivierten Zustand. Der Wert V_h ist mit -29.9 ± 0.4 mV fast 20 mV in den depolarisierten Spannungsbereich verschoben, während sich k_h mit 5.1 ± 0.1 mV ($n=14$) nur geringfügig im Vergleich zu 4444 verändert.

Für die Kanalinaktivierung von 9999_C4 (Abb. 3.9C) setzt der Übergang der Kanalpopulation von zu 100% aktivierbar zu 100% inaktiviert bereits außerhalb des Messbereiches ein und streckt sich über einen Spannungsbereich von mindestens 100 mV. Mit Werten von -82.7 ± 2.0 mV für V_h und 20.6 ± 0.5 mV ($n=3$) für k_h zeigte sich, dass die Chimäre die schwächste Spannungsabhängigkeit und den niedrigsten V_h -Wert im Vergleich mit allen anderen Chimären hat.

Für 4449_C4 (Abb. 3.9D) wurden folgende Werte gemessen: V_h -45.5 ± 0.7 mV und k_h 5.7 ± 0.1 mV ($n=12$), was ab -70 mV in einer Stromabnahme von Testpuls 2 resultierte. Die Chimäre 4449_C4 verhält sich hinsichtlich Kanalinaktivierung ähnlich wie 4444.

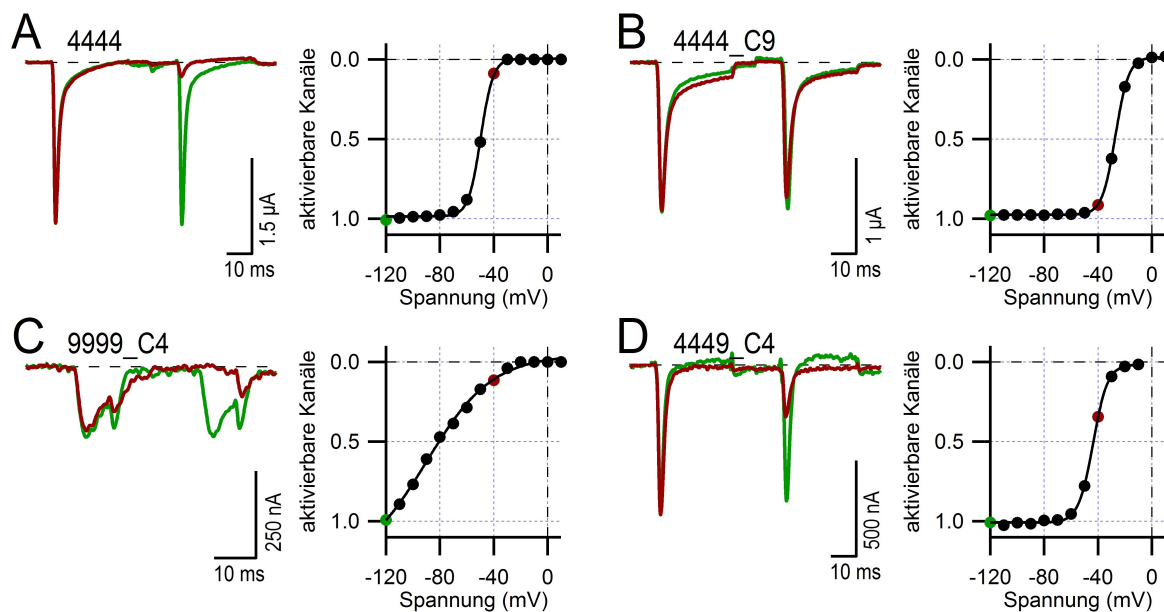


Abbildung 3.9: Die Gleichgewichts-Inaktivierung von Kanalchimären untersucht mit TEVC (Teil 1). **A-D** Repräsentative h_∞ -Messungen mit Stromspuren bei -120 und -40 mV Konditionierung (links). Die Verhältnisse aus Textpuls 2 und Testpuls 1 wurden über der Konditionierungsspannung aufgetragen und eine Kurve nach Gleichung 2.2 angepasst. Aufgeführt sind die Chimären 4449_C4 (A), 4444_C9 (B), 9999_C4 (C) und 4444 (D).

Für die Chimäre 9444 (Abb. 3.10A) begann die Stromabnahme von Testpuls 2 auch bereits außerhalb des Spannungsmessbereichs von -120 mV und die Kanalinaktivierung

vollzog sich über einen Spannungsbereich von mindestens 100 mV. Die Werte für V_h und k_h betragen -68.7 ± 3.3 mV sowie 13.7 ± 3.3 mV ($n=5$).

In Abb. 3.10B sind Stromspuren für eine repräsentative Zelle von 4944 gezeigt. Wie bei 9444 und 9999_C4 beginnt die Verringerung aktivierbarer Kanäle aufgrund der Konditionierung bereits jenseits von Spannungen von -120 mV gefolgt. Der Übergang der Kanalpopulation aktivierbar zu inaktiviert vollzieht sich über einen Spannungsbereich von mindestens 70 mV. Es ergeben sich folgende Ergebnisse für V_h -82.3 ± 0.6 mV und für k_h 9.7 ± 0.6 mV ($n=9$).

Die Stromabnahme von Puls 2 bei Chimäre 44(94)4 (Abb. 3.10C) vollzieht sich über einen Spannungsbereich von 60 mV ab -100 mV, was sich auch anhand der Werte für V_h mit -66.9 ± 0.3 mV und k_h mit 6.2 ± 0.3 mV ($n=8$) zeigt. Bei der Untersuchung der Gleichgewichts-Inaktivierung von Kanalchimäre 4449 (Abb. 3.10D) wurde eine Stromabnahme ab -40 mV festgestellt, sodass V_h -22.9 ± 0.3 mV und k_h 5.3 ± 0.2 mV ($n=7$) betragen.

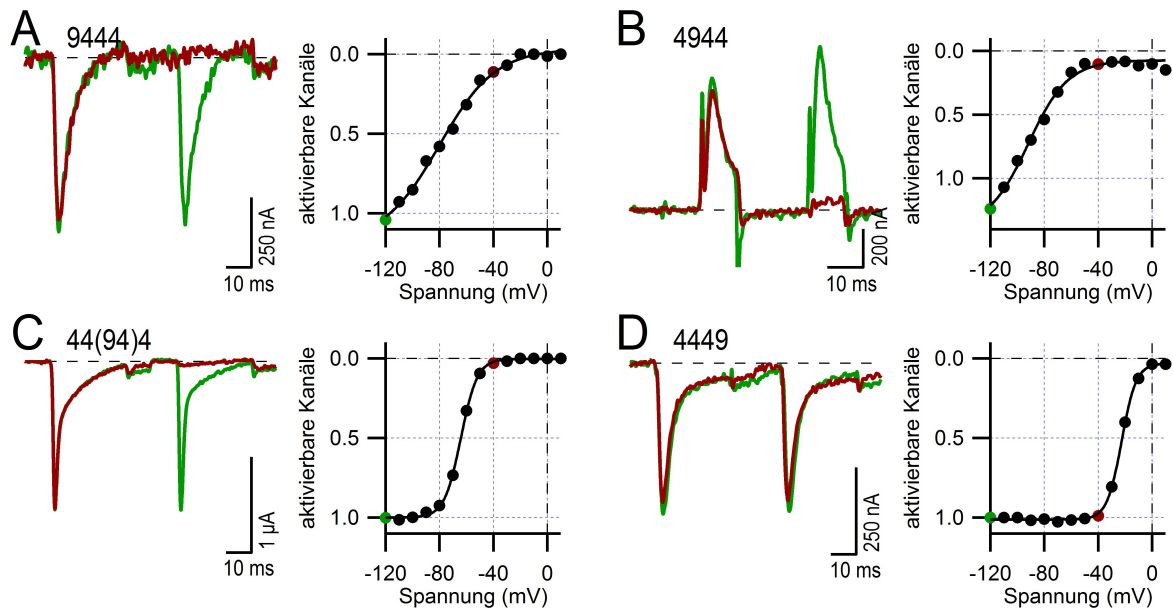


Abbildung 3.10: Die Gleichgewichts-Inaktivierung von Kanalchimären untersucht mit TEVC (Teil 2). **A-D** Repräsentative h_∞ -Messungen mit Stromspuren bei -120 und -40 mV Konditionierung (links). Die Verhältnisse aus Textpuls 2 und Testpuls 1 wurden über der Konditionierungsspannung aufgetragen und eine Kurve nach Gleichung 2.2 angepasst. Aufgeführt sind die Chimären 9444 (A), 4944 (B), 4494 (C) und 4449 (D).

Alle Werte für die halbmaximale Inaktivierungsspannung V_h und die Spannungsabhängigkeit k_h sind in Abb. 3.11 aufgeführt. Jede Domäne von hNav1.9 verändert die Gleichgewichts-Inaktivierung signifikant. Die V_h -Werte (Abb. 3.11A) unterscheiden sich um bis zu 30 mV von 4444 sowohl in depolarisierter als auch in hyperpolarisierter Span-

nungsrichtung.

Beim Vergleich der k_h -Werte (Abb. 3.11B) wird deutlich, dass sich alle Werte signifikant von 4444 unterscheiden. Während die Unterschiede von 44(94)4, 4449, 4449_C4 und 4444_C9 mit 1-2 mV vernachlässigbar klein sind, variieren die Werte von 9444, 4944 und 9999_C4 um mindestens 5-15 mV von 4444.

In Abb. 3.11C wurden die Differenzen von V_m und V_h von Chimären und 4444 aufgeführt. Damit soll gezeigt werden, wie sich die V_m - und V_h -Werte im Vergleich zu 4444 für jede Chimäre ändern. Während bei 9444 V_m in den depolarisierten Spannungsbereich verschoben ist, verlagert sich V_h in den hyperpolarisierten Bereich. Das trifft in noch stärkerem Umfang auch bei 4944 zu. Die Werte V_m und V_h von 44(94)4 sind in den hyperpolarisierten Spannungsbereich verschoben. Für 4449 und 4444_C9 sind V_m und V_h in depolarisierte Spannungsrichtung verändert. Die Werte V_m und V_h variieren bei der Chimäre 4449_C4 nicht von 4444. Bei 9999_C4 ist nur V_h in den hyperpolarisierten Spannungsbereich verschoben.

In Abb. 3.11D wurden die Differenzen von k_m und k_h von Chimären und 4444 aufgeführt. Mit Differenzen von 4444 für k_m und k_h von über 5 mV sind nur die Chimären 9444, 4944 und 9999_C4 betroffen.

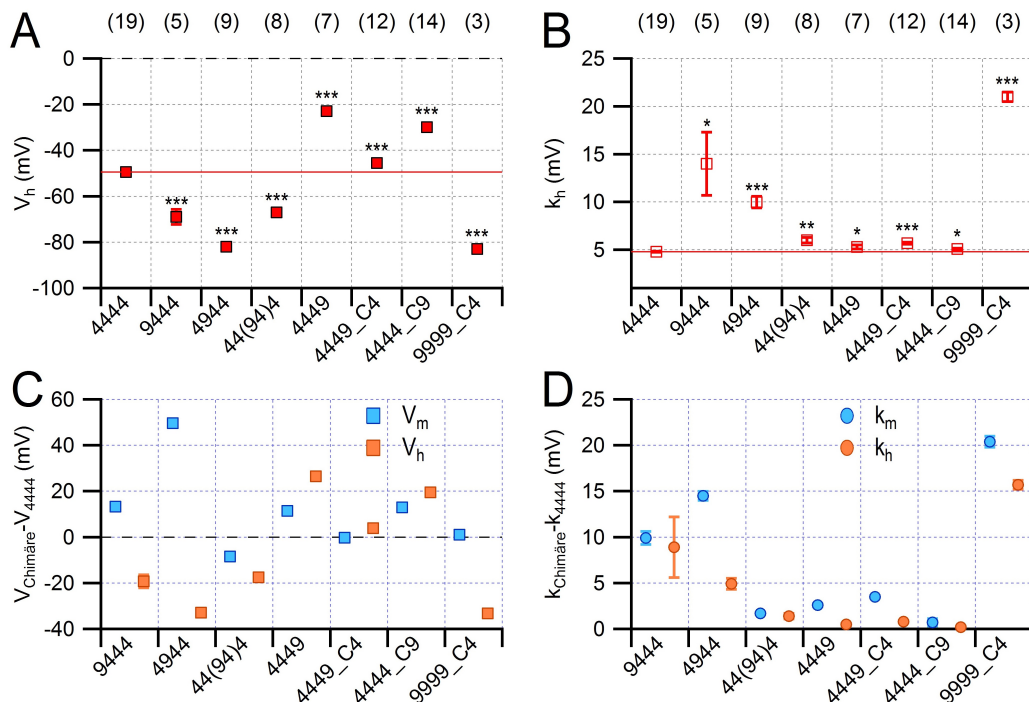


Abbildung 3.11: Die Parameter der Gleichgewichts-Inaktivierung der Kanalchimären unterscheiden sich teilweise sehr stark von 4444. **A** Parameter V_h aufgeführt für die jeweiligen Kanalchimären. Die roten Linien markieren den Mittelwert von Kontrollmessungen mit 4444. **B** Analog zu A aufgeführte Werte für k_h . **C** Differenzen der Parameter V_m und V_h der Chimären von 4444. **D** Differenzen der Parameter k_m und k_h von 4444.

Für V_m , k_m und k_h der Chimären lässt sich kein Trend hinsichtlich der Abhängigkeit der Verschiebung von einzelnen Domänen treffen. Allerdings zeigt sich, dass alle Chimären mit dem C-Terminus von hNa_V1.9 in den depolarisierten Spannungsbereich verschobene V_h -Werte besitzen.

3.1.5 Nachweis der Expression durch Modifikation der Stromantwort

Aufgrund der niedrigen Zeitauflösung der TEVC-Methode und des schlechten Verhältnisses von Signal zu Rauschen war es teilweise unmöglich wichtige Parameter wie das Umkehrpotential korrekt zu bestimmen. Es wurde also nach einer Möglichkeit gesucht um die Stromantworten zu vergrößern, zu verlängern und vom endogenen Strom unterscheiden zu können. Es war bekannt, dass der Austausch des Methionin zu Cystein im IFM-Motiv einen oxidationssensitiveren Na_V-Kanal erzeugt, welcher durch milde Cysteinmodifikation mit z. B. DTNP inaktivierungsdefizient wird [116]. Die oxidative Entfernung der schnellen Inaktivierung bewirkt auch eine Verlängerung der Kanaloffenzeit und damit eine deutliche Vergrößerung messbarer Stromantworten von Na_V1.8-/ Na_V1.4-Kanälen [47].

Die vorhandenen Na_V1.9-/ Na_V1.4-Chimären wurden als IFC-Mutanten (siehe Abschnitt 2.2.3) in Ab- und Anwesenheit des Thiolgruppenmodifikators DTNP gemessen. Es wurde vermutet, dass das membranpermeable DTNP durch die Membran diffundiert und am Cystein gebunden die schnelle Inaktivierung der Kanäle unterbindet. So konnten die Kanäle unter Kontrollbedingungen und im inaktivierungsdefizienten Zustand untersucht werden. Die Applikation des nicht membranpermeablen DTNB diente zur Kontrolle, da diese Substanz von außen appliziert keinen Einfluss auf intrazelluläre Cysteine haben sollte [117].

In Abb. 3.12A sind durch Depolarisationen auf -60 bis +80 mV ausgelöste Stromantworten von 9999_C4_IFC exprimierenden *Xenopus*-Oozyten in schwarz dargestellt. In ND96-Lösung wurden bei den meisten gemessenen Oozyten in Abwesenheit von Redox-Agenzien bei Membranspannungen von 0 mV nur in seltenen Fällen Einwärtsströme größer als 150 nA detektiert. Die Wirkung von 100 µM DTNP bestand darin, dass bereits etwa 60 s nach Applikation ein nicht inaktivierender Einwärtsstrom gemessen wurde (siehe Abb. 3.12B). Dabei war zu beobachten, dass nicht nur die Inaktivierung des einwärts gerichteten Na⁺-Stroms vollständig entfernt wurde, auch die Stromamplitude vergrößerte sich. Die Entfernung der schnellen Inaktivierung hatte einen Einfluss auf V_m mit -10.7 ± 0.8 mV nach Applikation von 100 µM DTNP und damit etwa 12 mV in depolarisierte Spannungsrichtung verschoben verglichen mit -22.1 ± 3.3 mV vor Applikation, wohingegen sich k_m mit vorher 23.5 ± 2.2 mV und nachher 24.4 ± 0.9 mV nicht signifikant veränderte.

Es wurden vier Kontrollmessungen mit 9999_C4_IFC durchgeführt, bei denen vor der

Applikation von DTNP jeweils 100 μM DTNB appliziert wurden. Innerhalb eines Zeitintervalls von 200 s hatte DTNB nur einen geringen Einfluss auf die schnelle Inaktivierung (Abb. 3.12C). Die Entfernung der schnellen Inaktivierung erfolgte im Anschluss durch Applikation von 100 μM DTNP und 1 μM TTX, wodurch auch endogener Na^+ -Strom geblockt werden konnte. Das zeigt, dass nur durch den membranpermeablen Cysteinmodifikator DTNP nicht inaktivierende TTX-resistente Ströme hervorgerufen werden können.

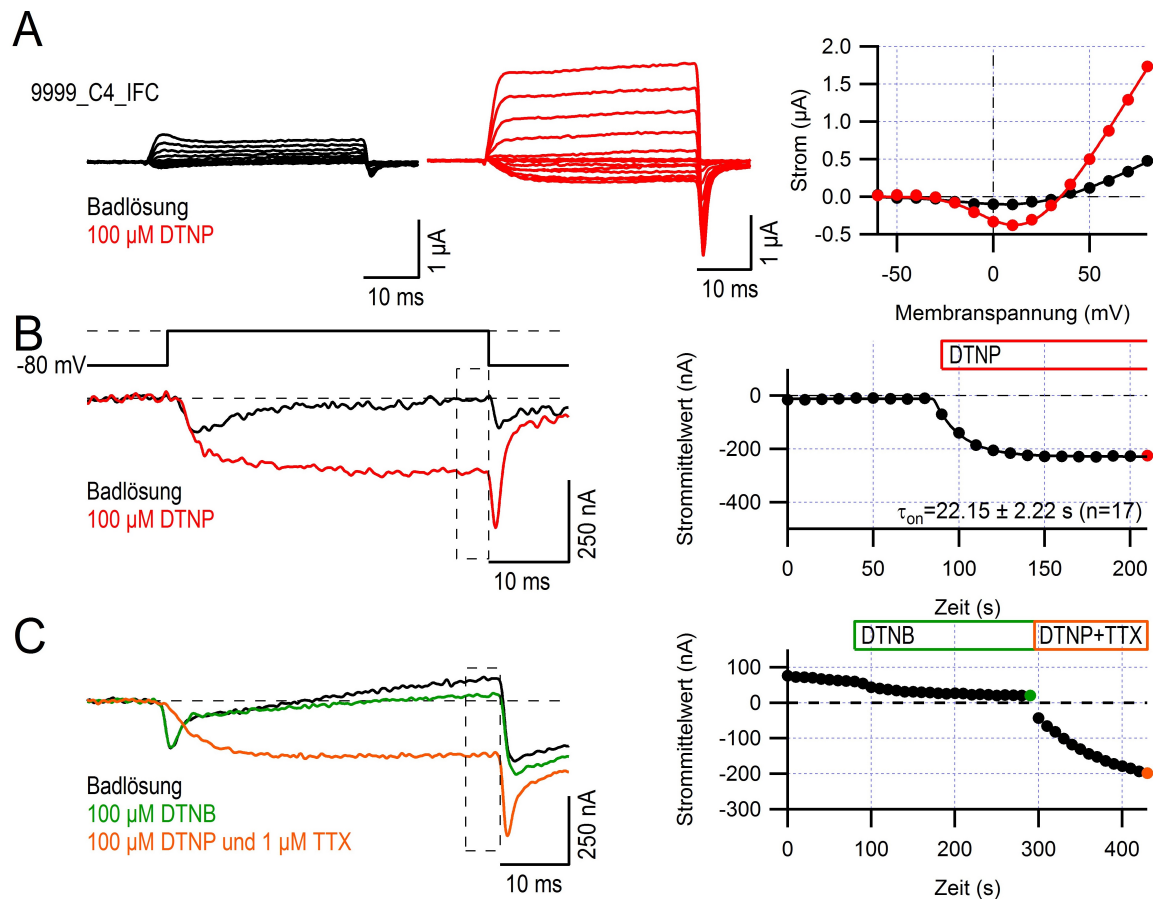


Abbildung 3.12: Entfernung der schnellen Inaktivierung von 9999_C4_IFC führt zu nichtinaktivierendem Na^+ -Strom. **A** Stromspuren mit Strom-Spannungskennlinie von TEVC-Messung vor (schwarz) und nach Applikation von 100 μM DTNP (rot). **B** Ausgewählte Stromspuren vor (schwarz) und nach Applikation von 100 μM DTNP (rot). Die Applikation von 100 μM DTNP ruft nichtinaktivierenden Strom hervor. **C** Stromspuren vor (schwarz) und 200 s nach Applikation von 100 μM DTNB (grün) sowie nach Applikation von 100 μM DTNP und 1 μM TTX (orange) gezeigt. Die Applikation von DTNB hat keinen Effekt auf die Inaktivierung bei 9999_C4_IFC. DTNP ruft auch in Anwesenheit von TTX nicht inaktivierenden Strom hervor. Durch 1 μM TTX wird außerdem endogener Na^+ -Strom geblockt.

Es konnte gezeigt werden, dass ein TTX-resistenter nichtinaktivierender Strom durch intrazelluläre Thiolmodifikation mit 100 μM DTNP ausgelöst wird. Als Kontrolle wur-

de die Mutation S360Y in 9999_C4_IFC erzeugt. Der Aminosäurerest Serin 360 ist im homologen Na_v1.8-Kanal verantwortlich für die TTX-Sensitivität oder -Resistenz [54].

Der Versuchsaufbau war für das Konstrukt 9999_C4_IFC_SY analog. Während die Applikation von 100 μ M DTNB keinen Einfluss auf 9999_C4_IFC_SY hatte, wurde durch die Applikation von 100 μ M DTNP reproduzierbar ein nichtinaktivierender Strom induziert (Abb. 3.13 A). Die anschließende Applikation von 100 μ M DTNP mit 1 μ M TTX führte zum vollständigen Kanalblock (Abb. 3.13 B). Die in Abb. 3.13 A gezeigten Stromspuren stellen die TTX-sensitiven Ströme dar, welche nach Subtraktion des Endogenstroms verbleiben.

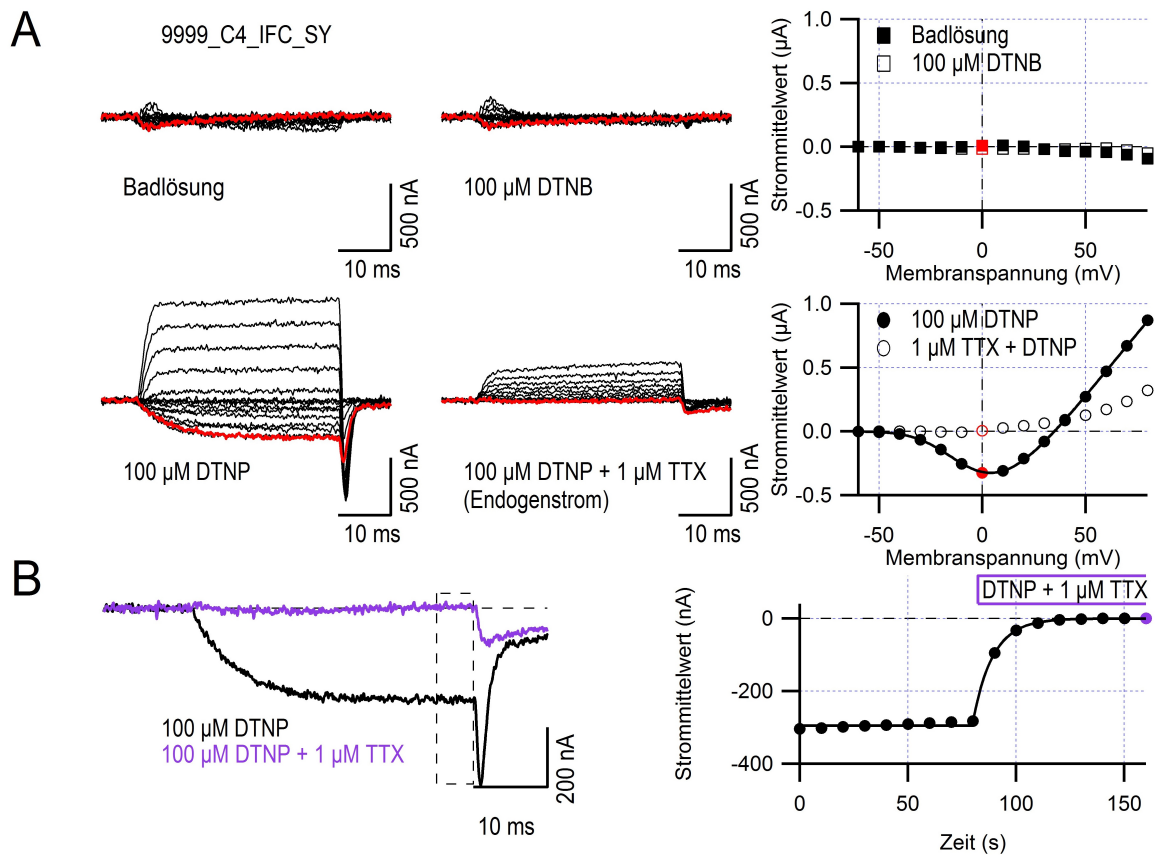


Abbildung 3.13: Die Mutation S360Y bewirkt TTX-Sensitivität von 9999_C4_IFC. **A** TTX-sensitive Ströme von 9999_C4_IFC_SY in Badlösung (oben links), in 100 μ M DTNB (oben Mitte), in 100 μ M DTNP (unten links) sowie der TTX-resistente Endogenstrom in 1 μ M + 100 μ M DTNP (unten Mitte). Strommittelwerte wurden aufgetragen über der Membranspannung (oben rechts, unten rechts). TTX-sensitive Ströme wurden durch Subtraktion des TTX-resistenten Endogenstroms erhalten. **B** Ausgewählte Stromspuren vor (schwarz) und nach Applikation von 1 μ M TTX + 100 μ M DTNP (violett). Die Applikation von 1 μ M TTX inhibiert den Einwärtsstrom mit einer Geschwindigkeitskonstante τ_{on} von 6.96 ± 1.29 s vollständig.

In Badlösung ergaben I(V)-Messungen für 9999_C4_IFC_SY Werte für V_m von -18.9

± 3.6 mV und für k_m von 20.8 ± 2.4 mV ($n=5$). Die Strom-Spannungskennlinien nach Applikation von $100 \mu\text{M}$ DTNP unterscheiden sich für V_m -21.5 ± 2.4 mV und für k_m 15.9 ± 1.3 mV ($n=5$) nur für k_m signifikant voneinander.

Die erhaltenen Daten lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Entfernung der schnellen Inaktivierung die Messbarkeit der schlecht funktionell exprimierenden 9999_C4-Chimäre deutlich verbessert. Aufgrund des triggerbaren Effekts konnte das Kanalverhalten in zwei unterschiedlichen Zuständen charakterisiert werden. Die Applikation von $1 \mu\text{M}$ TTX führte bei der TTX-resistenten Variante zu keiner Strominhibierung, während die putativ TTX-sensitive Variante vollständig geblockt wurde.

Die funktionelle Expression wurde für alle anderen Domänenchimären analog dazu überprüft. In Abb. 3.14 sind Stromspuren und Strom-Spannungskennlinien repräsentativer Messungen vor (schwarz) und nach Applikation von $100 \mu\text{M}$ DTNP aufgeführt (rot).

Die Chimäre 9444_IFC (Abb. 3.14A) reagierte auf $100 \mu\text{M}$ DTNP-Applikation reproduzierbar mit einer teilweisen Entfernung der schnellen Inaktivierung und einer Steigerung der Einstromamplitude. Die Parameter der $I(V)$ -Kurven unterscheiden sich mit V_m -17.5 ± 1 mV sowie k_m 14.5 ± 1 mV ($n=6$) vor und V_m -18.9 ± 0.9 mV sowie -10.9 ± 0.5 mV ($n=6$) nach Applikation von $100 \mu\text{M}$ DTNP nur bei k_m signifikant ($P<0.05$) voneinander.

Für die Chimäre 4944_IFC (Abb. 3.14B) war in Abwesenheit von DTNP aufgrund von Schalt- und Endogenstrom kein Einwärtsstrom messbar, nach Applikation von $100 \mu\text{M}$ DTNP ergaben sich Werte für V_m bei 14.9 ± 0.5 mV und für k_m bei 16.3 ± 0.5 mV ($n=9$).

In 45 gemessenen Zellen mit der Chimäre 4494_IFC (Abb. 3.14C) konnten auch nach DTNP-Applikation keine Na^+ -Ströme gemessen werden.

Bei der Chimäre 4449_IFC (Abb. 3.14D) ergeben sich vor Applikation für V_m -20.2 ± 0.6 mV sowie für k_m 7.4 ± 0.2 mV ($n=7$) und für V_m -19.3 ± 0.9 mV sowie k_m 6.7 ± 0.5 mV nach Applikation ($n=5$); die Werte vor und nach Applikation unterscheiden sich dabei nicht signifikant voneinander.

Chimäre 9999_C4_IFC (Abb. 3.14E) wurde zum Vergleich aufgetragen. Die Kanalmutante 4444_IFC (Abb. 3.14F) wurde als Kontrolle verwendet, da bereits bekannt war, dass das mutierte Inaktivierungsmotiv auf $100 \mu\text{M}$ DTNP mit Inaktivierungsentfernung reagiert [116]. Vor Applikation von DTNP beträgt V_m -26.4 ± 1.1 mV sowie k_m 9.4 ± 0.9 mV ($n=8$) und danach beträgt V_m -28.1 ± 0.8 sowie k_m 7.0 ± 0.8 mV ($n=5$); die Werte vor und nach Applikation von $100 \mu\text{M}$ DTNP unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

Dieser Ansatz erbrachte für 9999_IFC in 24 gemessenen Zellen keine messbaren Stromantworten nach Behandlung mit DTNP.

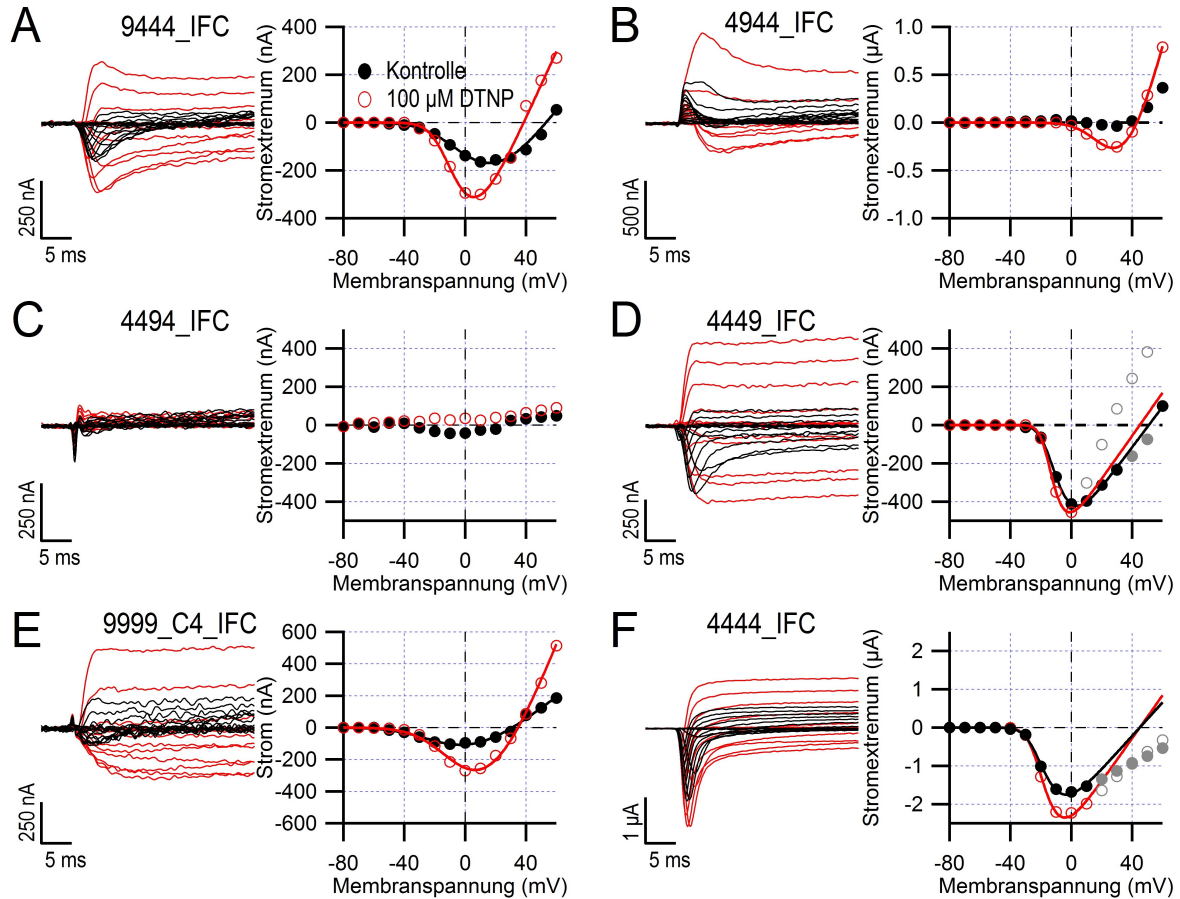


Abbildung 3.14: Die Cysteinmodifikation des mutierten Inaktivierungslinkers verlangsamt die schnelle Inaktivierung der funktionellen Kanalchimären nach DTNP-Applikation. **A-F** I(V)-Messungen mit 50 ms Depolarisationen auf -80 bis 60 mV vor (schwarz) und nach Applikation von 100 μ M DTNP (rot) der Chimären 9444_IFC (A), 4944_IFC (B), 4494_IFC (C), 4449_IFC (D), 9999_C4_IFC (E) und 4444_IFC (F). Stromspuren (links) und Strom-Spannungskennlinien (rechts) der Stromextrema bzw. Strommittelwerte aufgetragen über der Membranspannung vor (schwarz) und nach Applikation von 100 μ M DTNP (rot). Grau gefärbte Punkte wurden nicht für die Anpassung der I(V)-Kurve berücksichtigt.

Die Entfernung der schnellen Inaktivierung durch DTNP bewirkte bei den Chimären eine unterschiedlich starke Inaktivierungsdefizienz. Während sich die Chimären 9444_IFC, 4944_IFC wie 4444_IFC verhalten und die Stromamplitude nach Erreichen des Extremums wieder deutlich verringern, zeigen die Chimären 9999_C4_IFC und 4449_IFC mit dem Inaktivierungslinker von hNav1.9 einen deutlich langsameren Stromabfall.

In Abb. 3.15 sind die V_m - und k_m -Werte für die Chimären mit IFC-Mutation vor und nach Behandlung mit 100 μ M DTNP aufgeführt. Für V_m (Abb. 3.15A) zeigen sich außer bei 9999_C4_IFC keine signifikanten Veränderungen der Werte nach DTNP-Behandlung zu Kontrollbedingungen. Bei k_m unterscheiden sich 9444_IFC und 9999_C4_IFC_SY nach DTNP-Applikation signifikant von den Kontrollbedingungen.

Unklar ist, warum die DTNP-Behandlung der Chimären 9999_C4_IFC und 9999_C4_IFC_SY die V_m -Werte unterschiedlich beeinflusst. Es ist möglich, dass das Serin im "Wildtyp" eine Cysteinmodifikation in der äußeren Pore ermöglicht, welche durch das Tyrosin der S360Y-Mutation nicht sterisch möglich ist. Schlüssiger erscheint jedoch die Vermutung, dass der detektierte Strom vor DTNP-Behandlung durch Endogenstrom überlagert ist, was in stärkerem Umfang z. B. in Abb. 3.12C beobachtet werden kann. Die Kanalzusammensetzung des Endogenstroms wechselt von Injektion zu Injektion und ruft nicht nur TTX-sensitive Ströme hervor. Deshalb lassen sich Ströme TTX-resistenter Na_V -Kanäle nicht vollkommen isoliert untersuchen.

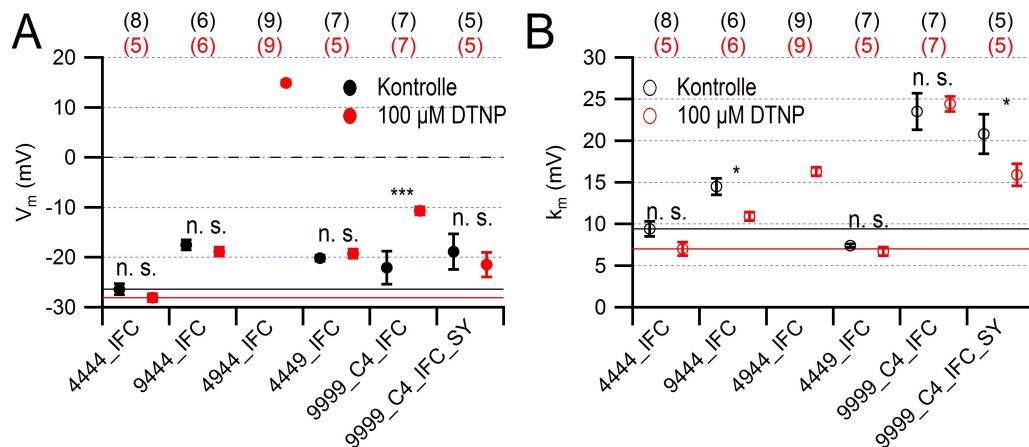


Abbildung 3.15: Die Parameter der Strom-Spannungskennlinien der Kanalchimären mit IFC-Mutation vor und nach Entfernung der schnellen Inaktivierung durch DTNP. **A** Parameter V_m für die jeweiligen Kanalchimären vor (schwarz) und nach Behandlung mit 100 μ M DTNP. **B** Analog zu A aufgeführte Werte für k_m . Die roten und schwarzen Linien markieren den Mittelwert von Kontrollmessungen mit 4444.

Die durchgeführten Experimente erlauben die Schlussfolgerung, dass die oxidative Entfernung der schnellen Inaktivierung durch 100 μ M DTNP dazu geeignet ist, die Stromantworten von IFC-Mutanten der Kanalchimären zu vergrößern und die Stromsignale vom endogenen Strom zu unterscheiden. Allerdings können keine Ströme von $hNa_V1.9$ durch Entfernung der schnellen Inaktivierung induziert werden. Daher mussten für die Untersuchung der Kanaleigenschaften von $hNa_V1.9$ weiterhin die funktionell exprimierbaren Kanalchimären genutzt werden.

3.1.6 IQM-Motiv bewirkt Inaktivierungsdefizienz von 9999_C4 und 4444

Für die pharmakologische Untersuchung von Ionenkanälen war die in Abschnitt 3.1.5 gezeigte Herangehensweise nicht geeignet. Dauerhaft musste ein Überschuss an Redoxmittel vorhanden sein. Das machte insbesondere die Untersuchung der Effekte von Proteintoxinen unmöglich, deren Tertiärstruktur durch Disulfidbrücken aufrechterhalten wird.

In einem Vorversuch wurde zunächst am gut untersuchten Kanal rNa_v1.4 getestet, ob Resultate mit rNa_v1.2 [133] und mit rNa_v1.4 [28] reproduzierbar waren. Dazu wurde der Kanal an der Position 1304 (Stelle 1324 für hNa_v1.9) so mutiert, dass das IFM-Motiv zu IQM verändert wurde. In Abb. 3.16A sind die Resultate für eine Beispielzelle gezeigt. Es fällt auf, dass der experimentelle Ansatz bei 4444_IQM zu einer deutlich verlangsamten schnellen Inaktivierung führt. Allerdings verringert sich die Stromamplitude nach Erreichen des Extremums innerhalb des 50 ms-Testpulses, wie es auch für rNa_v1.2 gezeigt wurde [133].

Die Messung von 9999_C4_IQM erfolgte analog zu 4444_IQM (Abb. 3.16B). Anders als bei der Kanalmutante 4444_IQM war bei 9999_C4_IQM die Stromabnahme innerhalb des 50 ms andauernden Depolarisationspulses deutlich geringer. Zur Messung des relativen verbliebenen Stroms am Ende des Testpulses wurde der Strommittelwert des Zeitraums 45 bis 47.5 ms des 50 ms-Pulses I_{End} durch die Stromamplitude I_{min} bei 20 mV dividiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.16C aufgeführt. Der verbliebene relative Strom $I_{\text{End}}/I_{\text{min}}$ ist für 9999_C4_IQM signifikant größer als für 4444_IQM ($P < 0.001$).

In Abb. 3.16D sind die Parameter der Strom-Spannungskennlinie für die Wildtypen und IQM-Mutanten aufgeführt. Die Mutation des IFM-Motivs bewirkt keine signifikanten Veränderungen von V_m . Die Spannungsabhängigkeit k_m von 4444_IQM wird signifikant schwächer und bei 9999_C4_IQM signifikant stärker. Das Umkehrpotential E_{rev} verändert sich für 4444_IQM nicht signifikant. Für 9999_C4_IQM ist E_{rev} signifikant in den depolarisierten Spannungsbereich verschoben und somit näher am berechneten Umkehrpotential bei 40-50 mV als 9999_C4 ($P < 0.01$).

Die Ergebnisse waren vergleichbar mit den Resultaten der Experimente mit den IFC-Mutanten. Auch dort verblieb für 4444_IFC nach DTNP-Applikation eine Komponente schnell inaktivierenden Stroms. Insgesamt scheint aber die Verwendung von IQM-Mutanten nicht nur die Messungen zu vereinfachen sondern auch die Kanaleigenschaften werden durch die Mutation nicht stark verändert. Damit kann die Mutation F1304Q als Hilfsmittel verwendet werden um die geringe Zeitauflösung der TEVC-Methode und damit verbundene Schwierigkeiten zu umgehen.

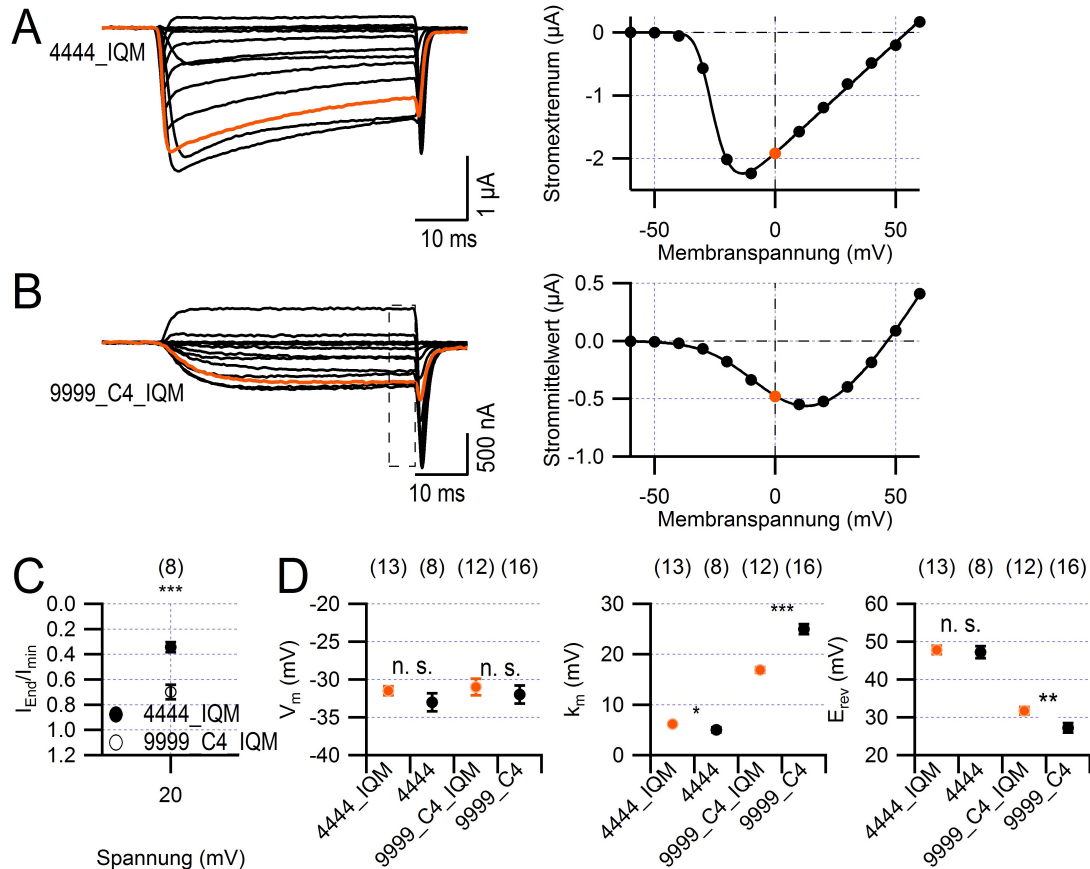


Abbildung 3.16: Das mutierte Inaktivierungslinkermotiv IQM verlangsamt schnelle Inaktivierung bei Na_V -Kanälen. **A-B** Stromspuren (links) von repräsentativen TEVC-Messungen von 4444_IQM (A) bzw. 9999_C4_IQM (B) und Strom-Spannungskennlinien (rechts) des maximalen Einstroms (4444_IQM) und des Durchschnittsstroms (9999_C4_IQM). Die Stromspuren und Stromextremum bzw. -mittelwert bei 0 mV sind orange hervorgehoben. **C** Relativer verbliebener Strom von 4444_IQM und 9999_C4_IQM als Verhältnis aus maximalem Einwärtsstrom und Durchschnittsstrom nach 45 bis 47.5 ms. Der verbliebene Strom ist bei 9999_C4_IQM (leere Kreise) bei 20 mV signifikant größer als bei 4444_IQM (ausgefüllte Kreise, $P < 0.001$). **D** Parameter der Strom-Spannungskennlinie V_m , k_m , E_{rev} für 4444_IQM, 4444, 9999_C4_IQM und 9999_C4.

Bei inaktivierungsdefizienten Kanälen waren während der Messungen Veränderungen des Umkehrpotentials zu beobachten (Abb. 3.17), was wahrscheinlich auf eine Erhöhung der intrazellulären Na^+ -Konzentration zurückzuführen war. Das bewirkte einen Stromverlust, welcher sich in niedrigeren Strommittelwerten, aber ohne Veränderung der Tailstromamplitude zeigte.

Wurde für die Auswertung die Tailstromamplitude verwendet, musste der endogene Anteil von der Amplitude subtrahiert werden. Bei den TTX-Experimenten wurde das durch 1 ml 100 nM TTX-Lösung erreicht, bei den STX-Experimenten durch 50 μ l einer

1 μM TTX-Lösung verwendet.

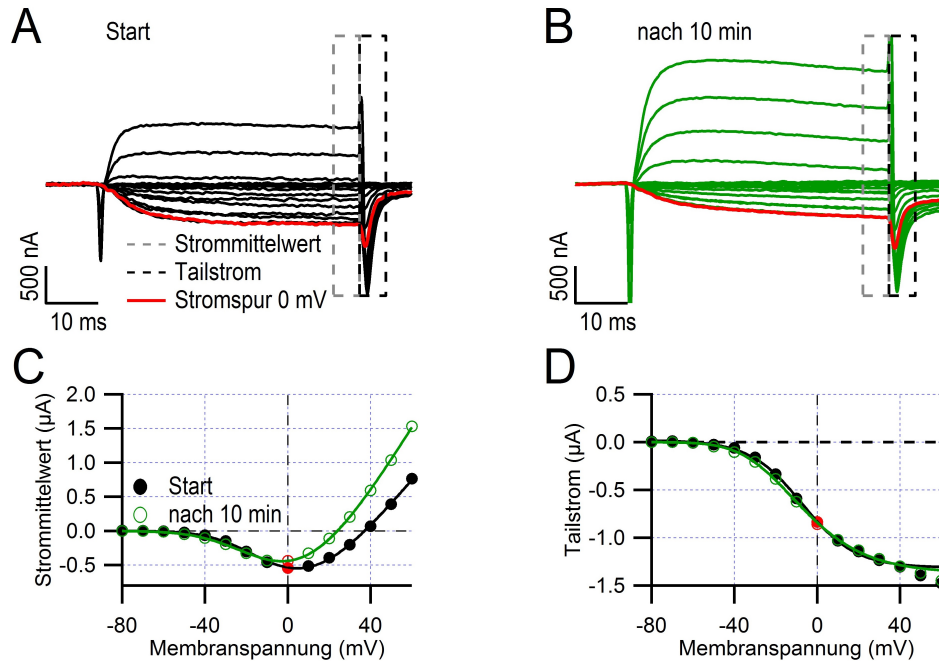


Abbildung 3.17: Während lang andauernder Messungen war der Einwärtsstrom von inaktivierungsdefizienten Na_V -Kanälen nicht stabil. **A** Stromantworten von 9999_C4_IQM hervorgerufen durch Depolarisation auf -80-60 mV 1 min nach Einstechen der Pipetten in die Zelle. **B** Stromantworten der gleichen Zelle 10 min nach Einstechen. **C** Die Wartezeit (grün) bewirkt eine Verschiebung des Umkehrpotentials von 9999_C4_IQM. **D** Beim Tailstrom waren keine Veränderungen messbar.

Durch die Verwendung inaktivierungsdefizienter Na_V -Kanäle konnten die Stromantworten der Chimären vom endogenen Strom unterschieden werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, wie nur die Applikation des membranpermeablen DTNP Inaktivierungsdefizienz auslöste. Dabei waren die Stromantworten inaktivierungsdefizienter Kanalpopulationen nicht nur verlängert sondern auch die Stromamplituden waren deutlich vergrößert. Die Parameter V_m sowie k_m und damit das Aktivierungsverhalten der Kanäle war aufgrund der verlangsamten Inaktivierung unverändert. In einem initialen Experiment wurde Serin 360 als TTX-Resistenz vermittelnder Aminosäurerest identifiziert. Die Stromantworten inaktivierungsdefizienter Kanäle wurden dabei als hinreichend stabil identifiziert, um weitere Toxinexperimente durchführen zu können.

3.2 hNav1.9 ist resistent für typische Porenblockertoxine

3.2.1 Serin 360 vermittelt TTX- und STX-Resistenz von hNav1.9

Da bereits gezeigt werden konnte, dass nicht inaktivierende Na⁺-Ströme TTX-sensitiver Kanalchimärenmutanten durch 1 µM TTX geblockt werden konnten, ging es im Anschluss darum, die Konzentrations-Wirkungsabhängigkeiten zu untersuchen. Das war insbesondere deshalb von Interesse, da bisher nicht gezeigt werden konnte, welche Aminosäurereste die TTX-Resistenz von hNav1.9 vermitteln.

Zu diesem Zweck wurde die TTX-Sensitivität für 4444_IQM, 9999_C4_IQM und 9999_C4_IQM_SY in *Xenopus*-Oozyten untersucht. Zunächst wurde der Basisstrom während 10 Pulsen quantifiziert, im Anschluss wurden TTX-Lösungen ansteigender Konzentrationen appliziert. Die Einstrominhibierung wurde für 4444_IQM als Kontrolle bei jeder Konzentration und 9999_C4_IQM_SY beim Erreichen eines Stromgrenzwertes bestimmt. Die Toxineffekte als Mittelwerte p_{Block} für die einzelnen Toxinkonzentrationen betrugen für 4444_IQM für 1 nM 0.117 ± 0.025 (n=5), für 5 nM 0.213 ± 0.013 (n=5), für 10 nM 0.401 ± 0.052 (n=5), für 20 nM 0.496 ± 0.048 (n=6), für 100 nM 0.884 ± 0.047 (n=5) und für 1 µM 1. Für 9999_C4_IQM waren die Ergebnisse für 1 nM 0.143 ± 0.025 (n=8), für 5 nM 0.511 ± 0.083 (n=5), für 10 nM 0.596 ± 0.041 (n=6), für 20 nM 0.778 ± 0.051 (n=4) und für 100 nM 1 (n=12).

In Abb. 3.18 werden Stromspuren der untersuchten Kanäle gezeigt. Für 4444_IQM (Abb. 3.18A) und 9999_C4_IQM_SY (Abb. 3.18C) sind deutliche Konzentrationsabhängigkeiten der Strominhibierung erkennbar. Zur Untersuchung der TTX-Resistenz von 9999_C4_IQM (Abb. 3.18B) wurde nach Applikation von 100 nM TTX keine Verringerung des Einstroms festgestellt.

Die IC₅₀ (Abb. 3.18D) von 4444_IQM beträgt 17 ± 2 nM und ein Hillkoeffizient k 0.97 ± 0.12 ; bei 9999_C4_IQM_SY waren es eine IC₅₀ von 5.6 ± 0.6 nM und k von 1.01 ± 0.12 . Damit ist 9999_C4_IQM_SY signifikant sensitiver für TTX als 4444_IQM ($P < 0.001$).

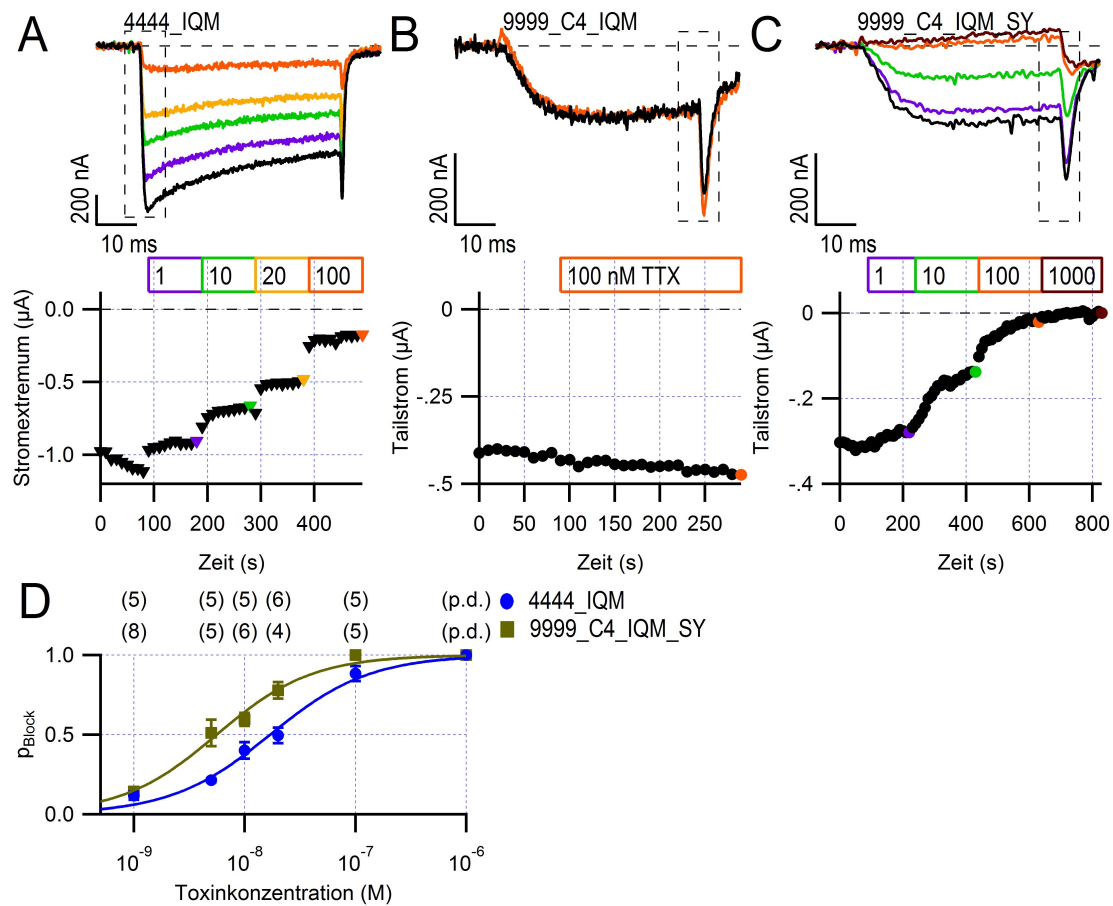


Abbildung 3.18: TTX bewirkt konzentrationsabhängige Inhibierung von 4444_IQM und 9999_C4_IQM_SY; jedoch nicht von 9999_C4_IQM. **A** Ausgewählte Stromspuren von 4444_IQM (oben) ohne Toxin (schwarz), in Anwesenheit von 1 nM (violett), 10 nM (grün), 20 nM (gelb), 100 nM (orange) TTX. Maximale Einwärtsströme zeigen Stromabnahme abhängig von Toxinkonzentration im zeitlichen Verlauf (unten). **B** Analog zu A durchgeführte Experimente für 9999_C4_IQM mit 100 nM TTX führen zu keiner Inhibierung des Einwärtsstroms. **C** Für Mutante 9999_C4_IQM_SY (Durchführung analog zu A) ähnliche Resultate wie 4444_IQM. Stromspuren (oben) illustrieren Inhibierung des Einwärtsstroms durch 1 nM (violett), 10 nM (grün), 100 nM (orange) und 1 μ M (rot) TTX. Zeitlicher Verlauf des Messung ist durch aufgetragenen Tailstrom (korrigiert um endogenen Tailstrom) unten gezeigt. **D** Konzentrations-Wirkungsbeziehungen nach Hill für TTX für 4444_IQM (blau) und 9999_C4_IQM_SY (beige).

Durch R. Blum wurden mit 50 ng/ml BDNF stimulierte, TTX-resistente, STX-sensitive Na^+ -Ströme nur in TrkB- und $\text{Na}_v1.9$ -transfizierten Zellen festgestellt [1]. Der Kanal $\text{hNa}_v1.7$ wurde als STX-resistent identifiziert [49]. Diese unerwarteten Sachverhalte erforderten es, die Sensitivität von $\text{hNa}_v1.9$ für STX mithilfe von 9999_C4 zu untersuchen. Die Versuche wurden analog zu den TTX-Experimenten durchgeführt.

Durch Depolarisationen ausgelöste Ströme von 4444_IQM wurden durch STX-Konzentrationen von 465 nM und 186 nM zu 100% (jeweils $n=3$) vollständig inhibiert. Konzentrationen von 18.6 nM STX verringerten die Amplitude um $88.2 \pm 3.8\%$ ($n=4$), 3.72 nM um $61.2 \pm 6.4\%$ ($n=3$) und 1.86 nM um $48.5 \pm 11.5\%$ ($n=6$) des Stroms. Wie bei 4444_IQM wurden 9999_C4_IQM_SY-Ströme durch STX der Konzentrationen 465 nM und 186 nM zu 100% (je $n=3$) vollständig inhibiert. 18.6 nM STX bewirkten eine Strominhibierung von $82.5 \pm 3\%$ ($n=3$), 3.72 nM STX von $46 \pm 0.6\%$ ($n=3$) und 1.86 nM STX von $42.3 \pm 4\%$ ($n=4$).

Bei 9999_C4_IQM (Abb. 3.19B) wurde eine niedrig verdünnte Lösung (186 nM) appliziert, welche zu einem vollständigen Block von 4444_IQM und 9999_C4_IQM_SY geführt hatte. Während 4444_IQM und 9999_C4_IQM_SY sehr ähnlich von den gleichen Toxinlösungen beeinflusst wurden, hatte das Toxin bei 9999_C4_IQM nur einen geringen Einfluss auf den Durchschnittsstrom, der Tailstrom blieb unverändert. Das bedeutet, dass 9999_C4_IQM STX-resistent ist; die Ursache der Einstromverringering ist wohl auf einen Anstieg des endogenen Auswärtsstroms oder eine Veränderung des Natriummkehrpotentials durch exzessiven Na^+ -Einstrom zurückzuführen (siehe Abb. 2.6). Die IC_{50} (Abb. 3.19D) von 4444_IQM wurde für die Kalibrierung definiert als 2.5 ± 0.05 nM (siehe [63]), k entsprach 0.9 ± 0.06 . Für 9999_C4_IQM_SY wurde eine IC_{50} von 3.7 ± 0.1 nM ermittelt; k betrug 0.86 ± 0.15 . Der signifikante Unterschied der IC_{50} von 1.2 nM ($P < 0.001$) ist zu vernachlässigen, weil sich die p_{Block} -Werte bei keiner applizierten STX-Konzentration signifikant voneinander unterscheiden.

Die Applikation von 185.6 nM STX inhibierte $46.3 \pm 7.1\%$ des $\text{hNa}_v1.7$ -Stroms ($n=4$). Aus der Literatur ist ein IC_{50} -Wert für $\text{hNa}_v1.7$ von 702 ± 53 nM bekannt [49]. Es ist unklar, warum der Unterschied zu den Literaturwerten so groß ist. Möglicherweise hatte das andere Expressionssystem (CHO-Zellen) Auswirkungen auf den STX-Block.

Dennoch zeigte sich, dass $\text{hNa}_v1.7$ deutlich weniger sensitiv für STX war als 4444_IQM bzw. 9999_C4_IQM_SY. Es ließ sich jedoch nicht bestätigen, dass der TTX-resistente $\text{Na}_v1.9$ -Strom durch STX geblockt wird. Es zeigte sich, dass selbst eine fast 20-fach höhere Konzentration keine Auswirkungen auf die Stromamplitude von 9999_C4_IQM hatte.

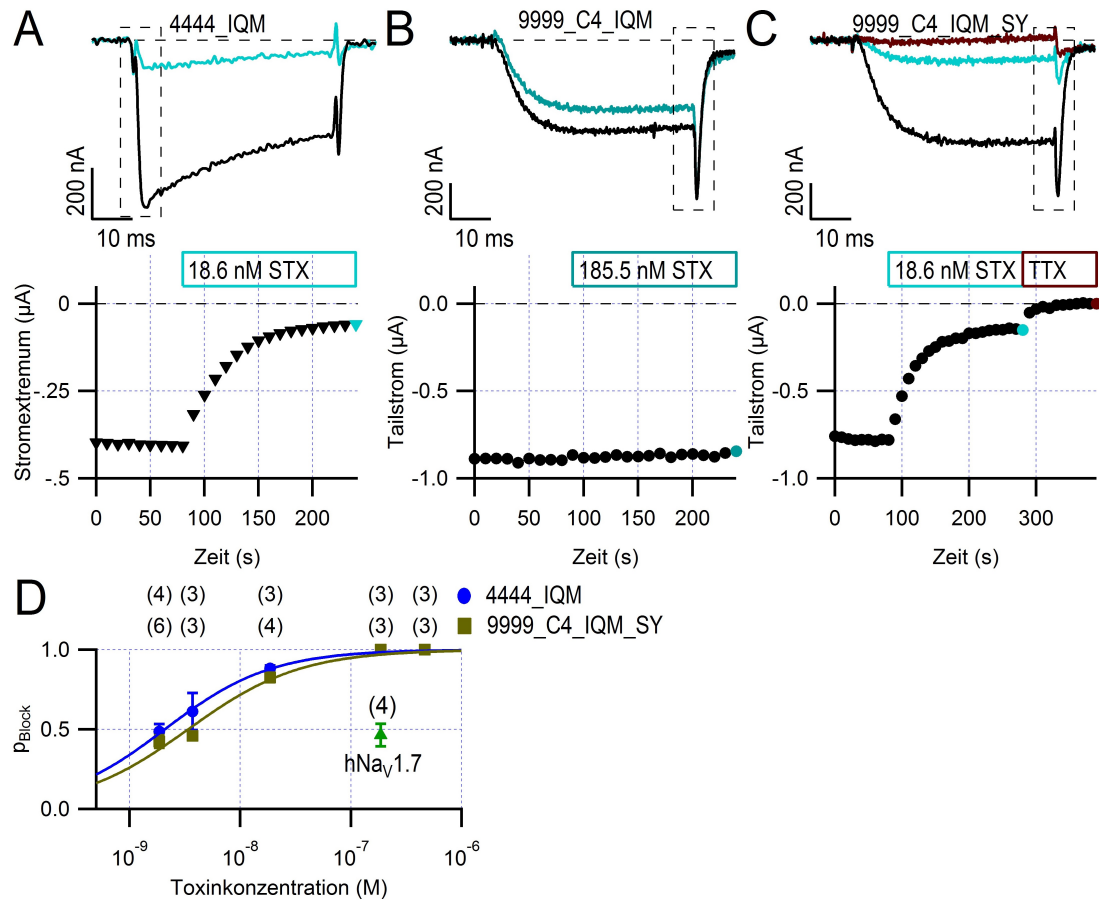


Abbildung 3.19: STX blockiert 4444_IQM und 9999_C4_IQM_SY; 9999_C4_IQM ist jedoch STX-resistent. **A** Stromspuren von 4444_IQM (oben) vor (schwarz) und nach (hellblau) Applikation von 18.6 nM STX. Die zeitliche Entwicklung (unten) zeigt Erreichen des maximalen Toxineffekts nach etwa 100 s. **B** Eine analoge Messung zu A mit 9999_C4_IQM verdeutlicht die Resistenz des Kanals gegenüber 185.5 nM STX. Während der Messung ist zwar eine Inhibierung des Einwärtsstroms (oben) erkennbar, aber der Tailstrom (unten) bleibt konstant. **C** Für 9999_C4_IQM_S360Y bewirkt die Applikation von 18.6 nM STX eine ähnliche Inhibierung des Einwärtsstroms (oben) und des Tailstroms (unten) wie bei 4444_IQM. Der endogene Tailstrom wurde durch 1 μM TTX quantifiziert, der Tailstrom (unten) durch Subtraktion des Endogenstroms korrigiert. **D** Konzentrations-Wirkungsbeziehungen nach Hill für STX für 4444_IQM (blau) und 9999_C4_IQM_SY (beige).

3.2.2 hNav1.9 ist μ SIIIA-resistent

Für die beiden anderen TTX-resistenten Kanäle $\text{Na}_V1.5$ und $\text{Na}_V1.8$ war bekannt, dass sie resistent gegen μ SIIIA sind [114]. Über die Toxikologie von hNav1.9 ist bisher so gut wie nichts bekannt. Die bisherigen Ergebnisse lassen aber die Schlussfolgerung zu, dass sich 9999_C4 wie eine TTX-resistente Na_V -Pore verhält. Das folgende Experiment wurde deshalb zur Vervollständigung der Kenntnisse über die Kanalspezifität von μ SIIIA durchgeführt.

Die Toxinapplikation erfolgte durch Einmischen von 25 μl einer 20 μM μ SIIIA-Lösung. Zunächst wurden Kontrollmessungen mit 4444_IQM durchgeführt, von diesem Kanal war die Sensitivität für μ SIIIA bereits bekannt [114]. In Abb. 3.20A wird eine repräsentative Stromspur von 4444_IQM vor (schwarz) und nach (blau) Applikation von 10 μM μ SIIIA gezeigt. Der maximale Toxineffekt ist nach etwa 100 s erreicht. Die Beispielmessung für 9999_C4_IQM in Abb. 3.20B zeigt, dass die Applikation von 10 μM μ SIIIA zu keiner Einwärtsstrom-Verringerung führt. Der zeitliche Verlauf des Tailstroms zeigt keine Inhibition und damit eine Resistenz für 9999_C4_IQM gegenüber μ SIIIA an.

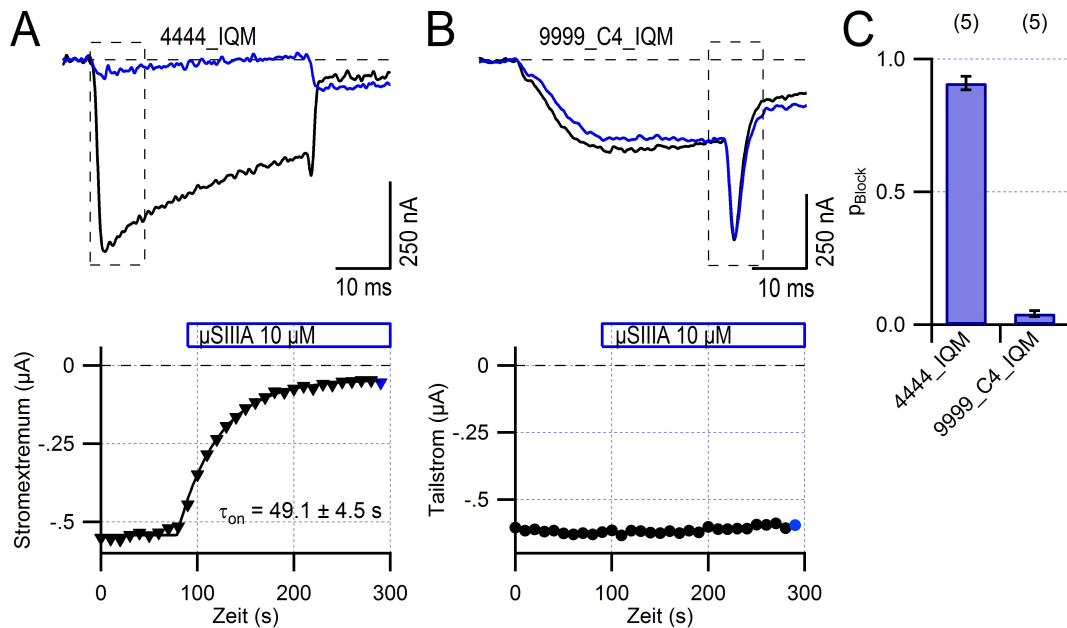


Abbildung 3.20: Die Chimäre 9999_C4_IQM ist insensitive für μ SIIIA. **A** Stromspuren (oben) von 4444_IQM vor (schwarz) und nach (blau) Applikation von 10 μM μ SIIIA. Der zeitliche Verlauf des Maximizeinstroms zeigt Erreichen des maximalen Toxineffekts innerhalb von 100 s an. **B** Stromspuren (oben) von 9999_C4_IQM vor (schwarz) und nach (blau) Applikation von 10 μM μ SIIIA. Der zeitliche Verlauf (unten) zeigt keinen μ SIIIA-Effekt auf den Tailstrom an. **C** Die durchschnittliche relative Strominhibition p_{Block} durch 10 μM μ SIIIA beträgt für 4444_IQM 0.91 ± 0.03 bzw. für 9999_C4_IQM 0.04 ± 0.01 .

3.3 Na_V-Kanäle untersucht in Säugerzellkulturen

3.3.1 Funktionelle Expression von hNa_V1.9 in ND7/23-Zellen

Von C. G. Vanoye konnten hNa_V1.9-Kanäle in ND7/23-Zellen funktionell exprimiert werden [8]. Vorher konnte bereits gezeigt werden, dass ND7/23-Zellen sehr gut zur funktionellen Charakterisierung von Na_V1.8 geeignet sind [24]. Da uns bis zu diesem Zeitpunkt die Untersuchung von hNa_V1.9 in *Xenopus*-Oozyten nicht gelungen war, wurden auch Experimente mit ND7/23-Zellen durchgeführt.

Wie bei unserem Vorgehen in *Xenopus*-Oozyten wurden zunächst verschiedene Wildtypkanäle in ND7/23-Zellen funktionell charakterisiert. Die funktionelle Expression erfolgte nach Angaben (siehe Abschnitt 2.3.3). Endogene Na_V-Kanäle wurden durch 300 nM TTX und endogene K_V-Kanäle durch Cs⁺ inhibiert. Ausgehend von einem Haltepotential bei -140 mV wurden die Zellen 10 min nach der Herstellung der elektrischen Verbindung zum Zytoplasma zur Quantifizierung der exprimierten Kanäle mit Rechteckpulsen aller 3 s auf Membranspannungen von -120 bis 60 mV im Abstand von 10 mV für 80 ms depolarisiert.

Um rNa_V1.4-Ströme in Anwesenheit von 300 nM TTX messen zu können, wurde die TTX-resistente Mutante Y401S verwendet. Diese Herangehensweise ist weit verbreitet, damit in ihrem Schaltverhalten weitgehend unbeeinflusste TTX-sensitive Na_V-Kanäle in neuronalen Zellkulturen untersucht werden können [103, 126]. So resultierte die Membrandepolarisation transfizierter Zellen in schnell aktivierenden und schnell vollständig inaktivierenden Stromsignalen (Abb. 3.21A). Das Stromereignis der Kanalpopulation dauerte dabei höchstens 5 ms. Die über den korrespondierenden Membranspannungen aufgetragenen Stromextrema (Abb. 3.21A) zeigen eine Strom-Spannungskennlinie für Na_V-Kanäle, welche in diesem speziellen Fall ab -50 mV eine Stromveränderung zeigen. Die I(V)-Parameter betragen für V_m -35.6 ± 1.4 mV und für k_m 7.4 ± 0.6 mV (n=7).

Im Vergleich dazu sind die Stromspuren von hNa_V1.8 (Abb. 3.21B) von langsamerer Kinetik. Die Membrandepolarisation bewirkt zwar einen schnell aktivierenden und schnell inaktivierenden Na⁺-Strom. Allerdings inaktivieren die Kanäle nicht vollständig und es verbleiben 10% des Stroms als persistierende Komponente. Das Stromereignis ist deutlich länger als bei rNa_V1.4_YS, da die Inaktivierung deutlich langsamer ist. Ab ca. -40 mV und damit bei stärker depolarisierter Membranspannung sind sichtbare Stromveränderungen zu detektieren (Abb. 3.21B). Das zeigt sich anhand der I(V)-Parameter, sie betragen für V_m -16.3 ± 2.9 mV und für k_m 14.4 ± 1.1 mV (n=5).

In Abb. 3.21C ist eine Beispielmessung für funktionell exprimierte hNa_V1.9-Ströme gezeigt. Die Depolarisation der Zellmembran führt zu einem langsam aktivierenden, sehr langsam inaktivierenden Strom mit großer persistierender Komponente. Deutliche Stromveränderungen sind im Vergleich zu den anderen beiden Kanälen schon im hyperpolari-

sierten Spannungsbereich um das Ruhemembranpotential von neuronalen Zellen bei etwa -70 mV detektierbar und bei -60 mV können sehr langsam inaktivierende Stromereignisse gemessen werden (Abb. 3.21C). Das verdeutlicht sich anhand der Werte für die Stromspannungskennlinie, V_m beträgt -63.9 ± 2.6 mV und k_m beträgt 13.2 ± 0.8 mV ($n=13$).

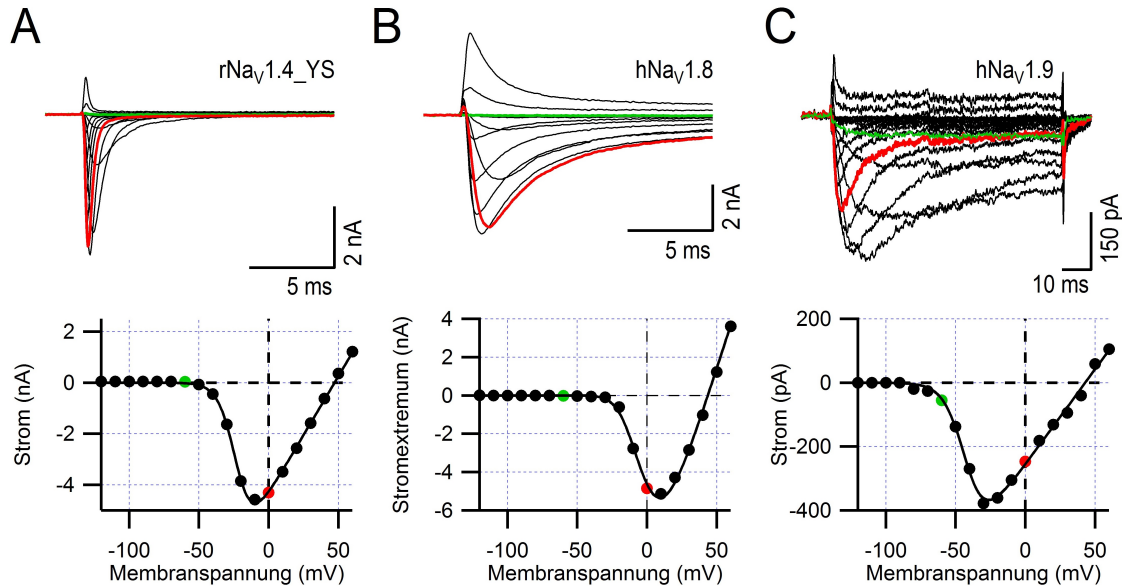


Abbildung 3.21: Die Hybridzelllinie ND7/23 ist geeignet für die Expression von hNa_V1.9-Kanälen. **A** TTX-resistente Ströme einer Zelle transfiziert mit rNa_V1.4_YS einer Patch-Clamp-Messung in Ganzzellkonfiguration. Depolarisationen führen zu schnell aktivierenden und inaktivierenden Na⁺-Strömen (oben). Über der Membranspannung aufgetragene Stromextrema ergeben typische Strom-Spannungskennlinie (unten). Die Stromspuren und Stromextrema bei -60 mV (grün) und 0 mV (rot) wurden hervorgehoben. **B** Analog zu A durchgeführtes Experiment mit hNa_V1.8 mit Stromspuren (oben) und Strom-Spannungskennlinie (unten). **C** Depolarisationen lösen bei hNa_V1.9-transfizierten Zellen langsam aktivierende, persistierende Stromantworten aus (oben). Stromextrema aufgetragen über der Membranspannung ergeben eine typische Strom-Spannungskennlinie (unten), wobei die Stromveränderungen im Bereich des Ruhepotentials von neuronalen Zellen ab -70 mV gemessen wurden.

Wie in *Xenopus*-Oozyten wurde neben der Strom-Spannungskennlinie auch die Kanalaktivierung im Gleichgewicht charakterisiert. In Abbildung 3.22 sind der Übersichtlichkeit wegen nur je zwei repräsentative Stromspuren bei Konditionierungsspannungen von -140 (grün) und -70 mV (rot) für die untersuchten Na_V-Kanalisoformen gezeigt.

Für rNa_V1.4_YS konnte beobachtet werden, dass eine Veränderung des Spannungsvorpulses von der Haltespannung auf -70 mV den Na⁺-Einstrom um etwa 30% verringert (Abb. 3.22A). Die Boltzmann-Anpassung an alle Werte ergab für V_h -68.4 ± 2.7 mV und für k_h 5.0 ± 0.2 mV ($n=8$).

Bei hNa_V1.8 konnte eine stärkere Verringerung des Einstroms bei -70 mV Konditio-

nierung detektiert werden, welcher etwa 70% der Kanäle in einen inaktivierten Zustand überführte (Abb. 3.22B). Für hNa_V1.8 beträgt $V_h -73.2 \pm 1.4$ mV und $k_h 8.2 \pm 0.2$ mV ($n=5$).

In h_∞ -Messungen von hNa_V1.9 war fast keine Veränderung der Kanalverfügbarkeit zwischen Konditionierungen bei -140 und -70 mV zu beobachten (Abb. 3.22C). Es ergeben sich Messwerte für V_h von -56.9 ± 0.6 mV und für $k_h 8.9 \pm 0.2$ mV ($n=8$).

Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass die am stärksten depolarisierten Konditionierungen bei hNa_V1.8 und hNa_V1.9 aufgrund der persistierenden Stromkomponente zu keiner vollständigen Strominhibierung führten, während der Einstrom bei rNa_V1.4_YS komplett inaktiviert wurde. Die Ergebnisse bestätigen die Kenntnisse, dass die Gleichgewichts-Inaktivierung von hNa_V1.9 sehr deutlich in den depolarisierten Spannungsbereich verschoben ist.

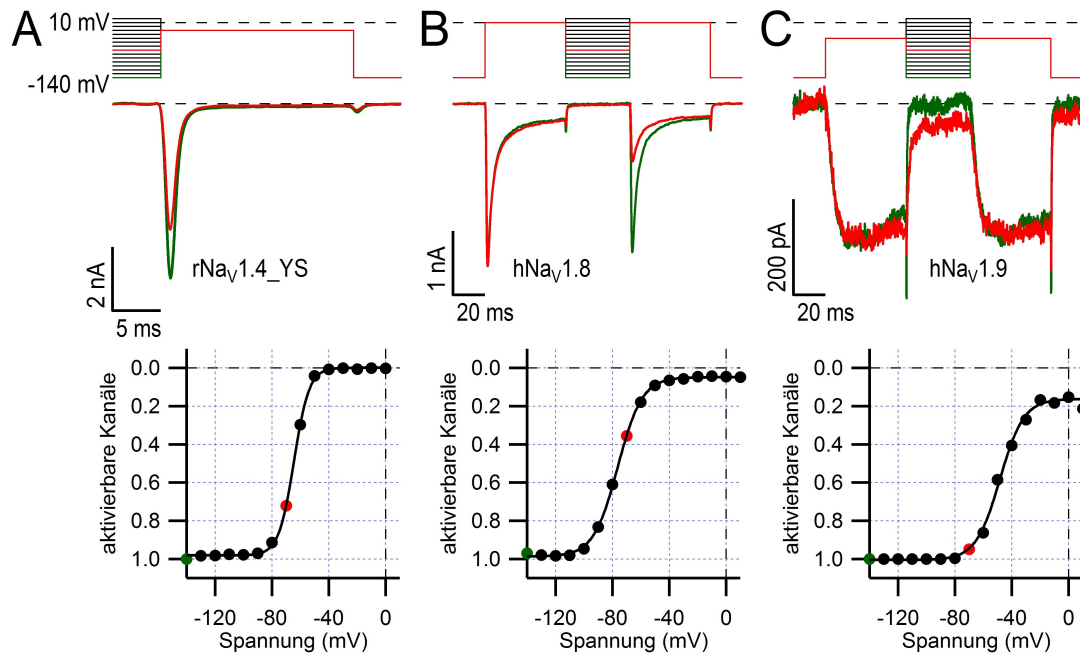


Abbildung 3.22: Die Gleichgewichts-Inaktivierung der Wildtypkanäle unterscheidet sich in ND7/23-Zellen sehr stark voneinander. **A** Repräsentative Stromspuren eines Patch-Clamp-Experiments von rNa_V1.4_YS in Ganzzellkonfiguration bei -140 (grün) und -70 mV (rot) Konditionierung. Ausgehend von einem Haltepotential bei -140 mV wurden die Kanäle für 500 ms bei Membranspannungen von -140 bis 10 mV konditioniert und der Strom mit einem 20 ms Testpuls quantifiziert. Anpassungsfunktion war Gleichung 2.2. **B-C** Analoge Vorgehensweise für hNa_V1.8 (B) und hNa_V1.9 (C) mit modifizierten Pulsprotokollen (oben).

3.3.2 C-Terminus von hNa_V1.9 beeinflusst Gleichgewichts-Inaktivierung

Mit Patch-Clamp-Experimenten wurden die C-Terminus-Chimären 4444_C9_YS und 9999_C4 in ND7/23-Zellen charakterisiert. Das Vorgehen war dabei analog zu den Wildtypkanälen. Zunächst wurde die funktionelle Expression durch Aufnahme von I(V)-Messungen in Anwesenheit von 300 nM TTX untersucht.

Die Stromspuren von 4444_C9_YS zeigen eine Na_V-typische Kinetik (Abb. 3.23A), was bereits in den TEVC-Messungen gezeigt werden konnte. Ab -40 mV waren Stromveränderungen zu detektieren und der maximale Einstrom wurde bei -10 mV erreicht. Die Strom-Spannungskurve ergab für V_h -26.6 ± 1.3 mV und für k_m 9.3 ± 0.7 mV ($n=8$).

Die funktionelle Expression von Chimäre 9999_C4 erfolgte durch 28 °C-Inkubation [8]. Die repräsentativen Stromspuren von 9999_C4 zeigen eine Na_V-typische Kinetik (Abb. 3.23B), auch wenn die Kanalkinetik viel langsamer ist als von 4444_C9_YS und ein Teil des Stroms persistiert. Bereits ab -70 mV konnten Stromveränderungen detektiert werden und der Einstrom erreichte bei -30 bis -20 mV sein Maximum. Das zeigt sich auch an den Werten für V_h mit -68.8 ± 2.3 mV und für mit k_m 11.8 ± 0.6 mV ($n=13$).

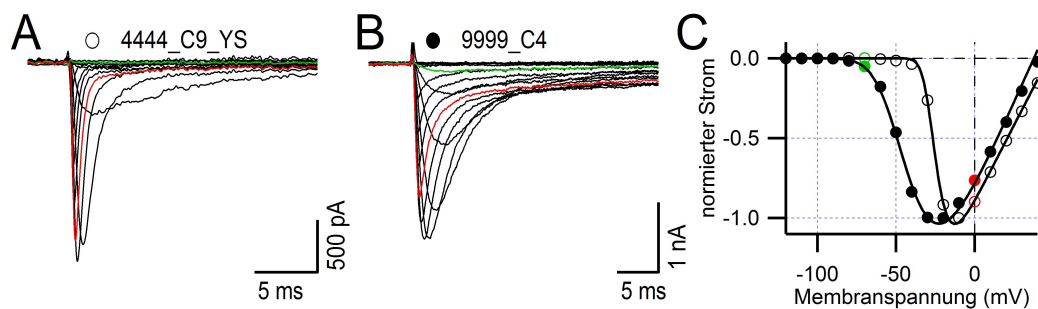


Abbildung 3.23: Die funktionelle Expression von Kanalchimären mit hNa_V1.9-Domänen ist in ND7/23-Zellen möglich. **A** Repräsentative Stromspuren von 4444_C9_YS in Anwesenheit von 300 nM TTX. Depolarisationen führen zu schnell aktivierenden und inaktivierenden Na⁺-Strömen. Stromspuren bei -70 mV grün und bei 0 mV hervorgehoben. **B** Analog zu A durchgeführtes Experiment mit 9999_C4 resultierte in Stromspuren mit langsamerer Kinetik. **C** Das Auftragen der Stromextrema über der korrespondierenden Membranspannung ergab typische Strom-Spannungskennlinien für 4444_C9_YS (offene Kreise) und 9999_C4 (gefüllte Kreise).

Die Kanalinaktivierung im Gleichgewicht wurde für die Kanalchimären mithilfe des h_∞ -Protokolls bestimmt. Zur besseren Übersicht sind nur Stromspuren bei -140 (grün) sowie -70 mV Konditionierung (rot) für repräsentative Messungen von 4444_C9_YS und 9999_C4 exprimiert in ND7/23-Zellen gezeigt (Abb. 3.24).

Für 4444_C9_YS führte die 500 ms andauernde Konditionierung bei -70 zu einem Anteil von etwa 20% inaktivierten Kanälen (Abb. 3.24A). Die Parameter der Anpas-

sungsfunktion sind für V_h -48.8 ± 1.8 mV und für k_h 6.9 ± 1 mV ($n=7$). Im Gegensatz dazu sind nach Konditionierung bei -70 mV fast alle 9999_C4-Kanäle inaktiviert. Das schlägt sich auch in den Werten für V_h mit -101.3 ± 1.1 mV und k_h mit $10.4 \pm 0,6$ mV ($n=10$) nieder (Abb. 3.24B).

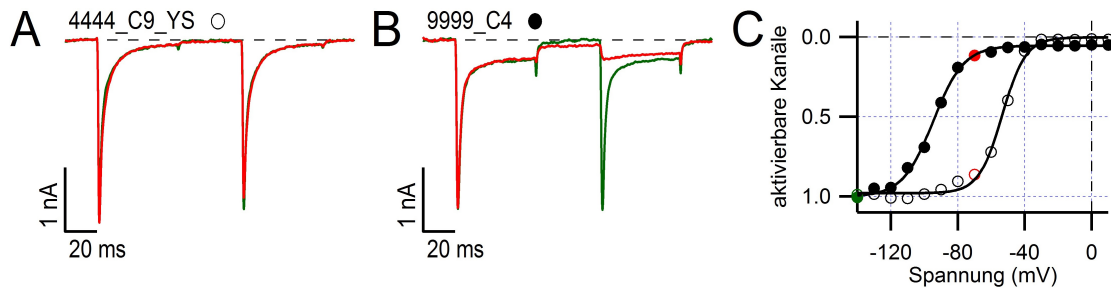


Abbildung 3.24: Die Gleichgewichts-Inaktivierung der Kanalchimären 4444_C9_YS und 9999_C4 untersucht in ND7/23-Zellen. **A** Repräsentative Stromspuren eines Patch-Clamp-Experiments von 4444_C9_YS bei -140 und -70 mV Konditionierung. Ausgehend von einem Haltepotential bei -140 mV wurden die Kanäle für 500 ms bei Membranspannungen von -140 bis 10 mV konditioniert und die Stromamplitude mit einem 50 ms Testpuls quantifiziert. **B** Analoge Vorgehensweise für 9999_C4. **C** Kanalverfügbarkeiten aufgetragen über der Konditionierungsspannung für 4444_C9_YS (offene Kreise) und 9999_C4 (gefüllte Kreise) angepasst mit Boltzmann-Funktion (Gleichung 2.2).

Zur Zusammenfassung sind die Parameter der Strom-Spannungskennlinien und der Gleichgewichts-Inaktivierung der Wildtypkanäle 4444 und 9999 sowie der Kanalchimären 4444_C9_YS und 9999_C4 in Abb. 3.25 aufgetragen.

Für die Strom-Spannungskennlinie zeigt sich, dass der Austausch des C-Terminus keine signifikante Verschiebung von V_m für 9999_C4 bewirkt ($P>0.05$), während V_m bei 4444_C9_YS signifikant in depolarisierte Spannungsrichtung im Vergleich zu 4444_YS verschoben wird ($P<0.001$). Die k_m -Werte der Wildtypkanäle unterscheiden sich stärker als die Chimären voneinander ($P<0.001$). So bewirkt der Austausch des C-Terminus bei 4444_C9_YS im Vergleich zu 4444_YS einen signifikant größeren k_m -Wert ($P<0.05$), während k_m von 9999_C4 tendenziell kleiner ist als bei 9999 ($P>0.05$).

Für die Gleichgewichts-Inaktivierung zeigt sich, dass V_h der Chimäre 4444_C9_YS im Vergleich zu 4444 um 20 mV in den depolarisierten Spannungsbereich verschoben ist, während 9999_C4 im Vergleich zu 9999 um über 40 mV in den hyperpolarisierten Bereich verschoben ist. Die k_h -Werte unterscheiden sich signifikant größer als für die jeweiligen Wildtypkontrollen ($P<0.05$).

Die Differenzen der halbmaximalen Aktivierungs- bzw. Inaktivierungsspannungen der untersuchten Kanäle (Abb. 3.25F) zu 4444_YS zeigen, dass V_m von 9999 um annähernd 30 mV in hyperpolarisierte Spannungsrichtung verschoben ist, während die V_h um etwa 15 mV in depolarisierte Richtung verschoben ist. Für 9999_C4 betrifft die Verschiebung

in hyperpolarisierte Spannungsrichtung um jeweils etwa 30 mV sowohl V_m als auch V_h . Zwar sind bei 4444_C9_YS sowohl V_m als auch V_h in depolarisierte Richtung verschoben, aber mit 20 mV ist die Verschiebung für V_h doppelt so groß wie für V_m . Es konnte also gezeigt werden, dass der Austausch des C-Terminus zu einer Übertragung von Inaktivierungseigenschaften des jeweiligen Donorkanals führt.

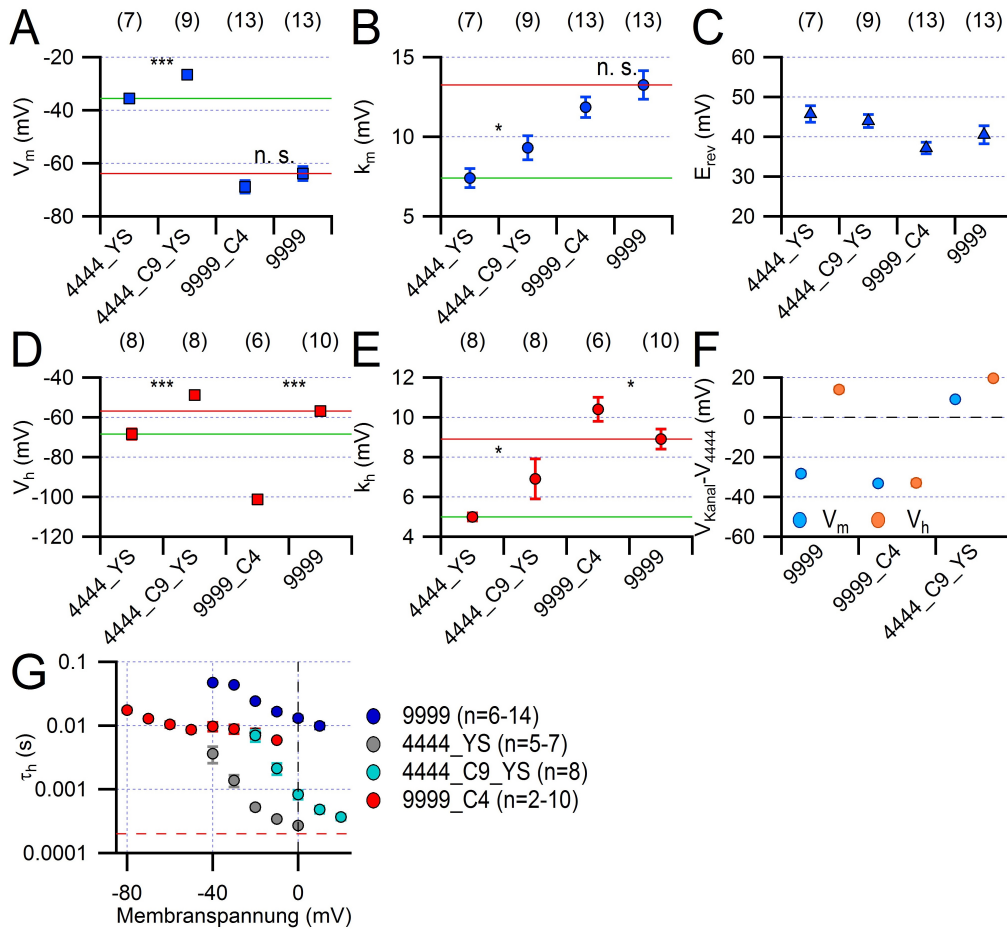


Abbildung 3.25: Die Parameter von Strom-Spannungskennlinie und Gleichgewichts-Inaktivierung von Na_V -Kanälen untersucht in ND7/23-Zellen. **A-C** Parameter der Strom-Spannungskennlinie V_m (A), k_m (B) und E_{rev} (C). Die rote Linie zeigt der Übersichtlichkeit wegen Mittelwerte für 9999 und die grüne Linie für 4444. **D-E** Parameter der Gleichgewichts-Inaktivierung V_h (D) und k_h (E). **F** Veränderungen der Werte V_m und V_h der Kanäle im Vergleich zu 4444. **G** τ_h -Werte der Na_V -Kanäle. Die Auflösungsgrenze wurde definiert als 200 μs .

Durch die Patch-Clamp-Messungen bestätigen sich die TEVC-Resultate der Kinetik der schnellen Inaktivierung (Abb. 3.25G). Die Kinetik von 4444_C9_YS ist mit 4444_YS vergleichbar. Während die Kinetik von 9999 deutlich langsamer ist, zeigt der Kurvenverlauf nach einer stationären Phase ab -30 mV eine Beschleunigung der Kinetik. Die Chimäre 9999_C4 hat eine andere Kinetik, bei welcher die Inaktivierung über einen Spannungsbereich von 70 mV halbiert.

So konnte gezeigt werden, dass die C-Termini von Na_V -Kanälen Einfluss auf das Schaltverhalten haben. Während der Austausch des C-Terminus die Kanalaktivierung nur bei 4444_C9_YS beeinflusste, konnten signifikante Unterschiede der Gleichgewichts-Inaktivierung bei 9999_C4 und 4444_C9_YS im Vergleich zum jeweiligen Wildtypkanal festgestellt werden.

Die Kinetik der schnellen Inaktivierung wurde durch den ausgetauschten C-Terminus nur bei 9999_C4 beschleunigt. Jedoch war die Kinetik im Vergleich zu 4444 immer noch deutlich langsamer und der C-Terminus von $\text{hNa}_V1.9$ konnte die langsame Inaktivierungskinetik nicht auf 4444_C9_YS übertragen. Es ist möglich, dass der C-Terminus von $\text{hNa}_V1.9$ die schnelle Inaktivierung beeinflusst. Allerdings scheint die Rolle des C-Terminus für andere Na_V -Kanäle eher unbedeutend zu sein. Andere Na_V -Kanalbestandteile müssen für die Kinetik der schnellen Inaktivierung wichtiger sein.

3.3.3 Die $\text{hNa}_V1.9$ -Inaktivierung ist IFM-vermittelt

In *Xenopus*-Oozyten hatte sich die Entfernung der schnellen Inaktivierung als hilfreich herausgestellt, um kleine Stromamplituden durch Verlängerung der Kanaloffenzeit zu vergrößern. Da die Stromantworten von $\text{hNa}_V1.9$ nur in seltenen Fällen 100 pA überschritten, wäre eine Vergrößerung der Amplitude wünschenswert.

Zunächst wurde diese Herangehensweise an 9999_C4_IFC als Positivkontrolle und 9999_C4 als Negativkontrolle angewendet. Als Quelle für die oxidative Modifikation des Cysteins bzw. Methionins wurden 200 μM Lucifer Yellow der Pipettenlösung zugesetzt, welches erst reaktive Spezies erzeugt, wenn es mit Blaulicht (450-490 nm) bestrahlt wird. Die Anwendung erfolgte wie beschrieben [112], die Dauer der Bestrahlung war auf 250 s begrenzt.

In Abb. 3.26A sind Stromspuren und Strom-Spannungskennlinien von 9999_C4_IFC vor und nach Bestrahlung der Zellen mit Blaulicht gezeigt. Es wird deutlich, dass die Entfernung der schnellen Inaktivierung auch in ND7/23-Zellen reproduzierbar durchgeführt werden konnte. Dabei hat die Behandlung mit Werten für V_m mit -59.8 ± 3.7 mV (davor) und -63.9 ± 3.8 mV (danach) keine signifikanten Auswirkungen ($P > 0.05$), jedoch wird k_m mit 17.6 ± 2.1 mV (davor, $n=5$) und 13.5 ± 0.6 mV (danach, $n=5$) signifikant verändert ($P < 0.05$).

In Abb. 3.26B sind von 9999_C4 Stromantworten und Strom-Spannungskennlinien mit analoger Vorgehensweise gezeigt. Es wird deutlich, dass die Behandlung mit Blaulicht die schnelle Inaktivierung kaum beeinflusst. Die reaktiven Spezies beeinflussen die Parameter der $I(V)$ -Kurven V_m -77.1 ± 3.3 mV (davor) und -85.6 ± 3.6 mV (danach) sowie k_m mit 9.5 ± 1.0 mV (davor, $n=5$) und 8.9 ± 1.3 mV (danach, $n=4$) nicht signifikant ($P > 0.05$).

Für die Bestimmung der verbliebenen Stromkomponente wurden die Strommittelwerte der Testpulse nach 70-80 ms ermittelt und durch die jeweiligen Stromextrema dividiert.

Die Werte sind in Abb. 3.26C aufgeführt. Es zeigt sich, dass die Stromamplitude bei 9999_C4_IFC nach Blaulichtbestrahlung zu 80 bis 100% erhalten bleibt, während sich die Werte bei 9999_C4 nicht signifikant ändern ($P>0.05$). Zudem ist die verbleibende Stromamplitude bereits vor Blaulichtbestrahlung von 9999_C4_IFC im Vergleich zu 9999_C4 mehr als doppelt so groß.

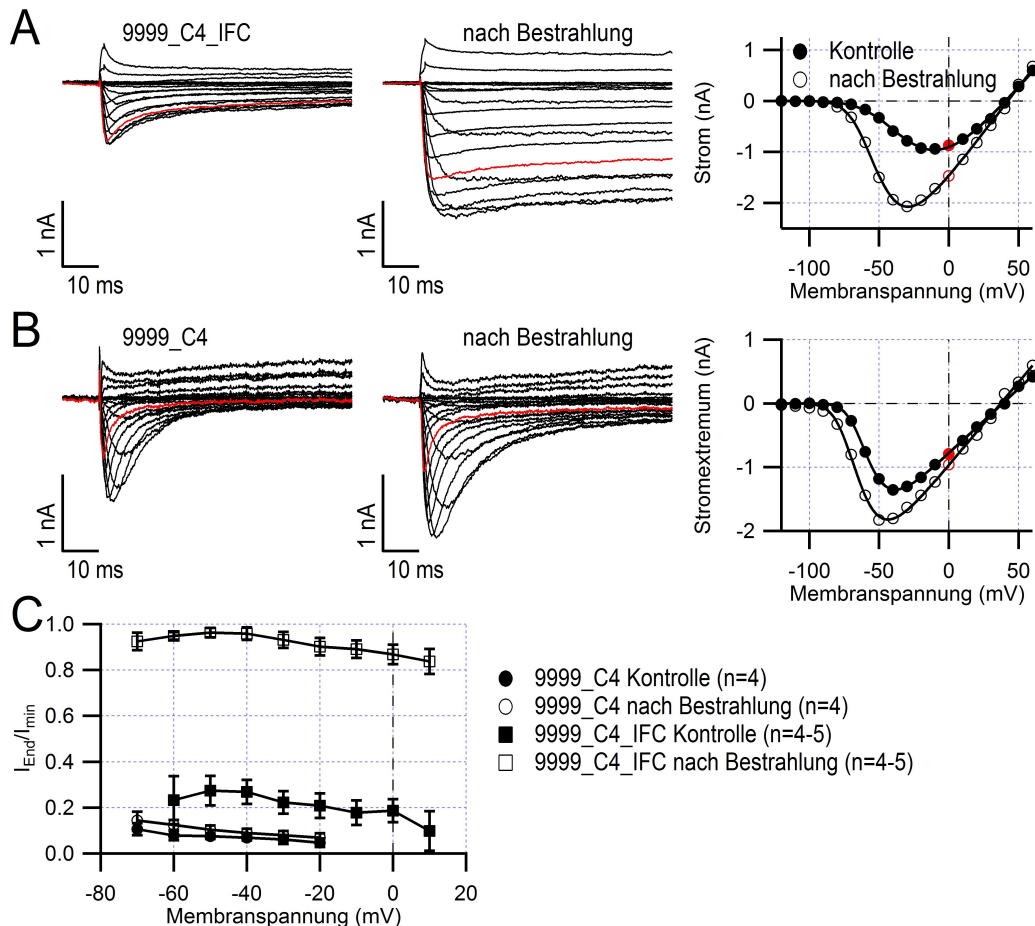


Abbildung 3.26: Entfernung der schnellen Inaktivierung von 9999_C4_IFC, jedoch nicht von 9999_C4, durch oxidative Modifikation des Inaktivierungslinkers mit 200 μ M Lucifer Yellow. **A** Stromantworten und Strom-Spannungskennlinien von 9999_C4_IFC exprimiert in ND7/23-Zellen vor und nach 250 s Bestrahlung mit Blaulicht. **B** Analoges Vorgehen zu A für Chimäre 9999_C4. **C** Verbliebene Stromamplitude des Testpulses nach 70-80 ms Pulsdauer (I_{End}/I_{min}) aufgetragen über der Membranspannung.

So konnte gezeigt werden, dass Lucifer Yellow geeignet ist, um die schnelle Inaktivierung von 9999_C4_IFC oxidativ zu modifizieren, während 9999_C4 kaum beeinflusst wurde. Für 9999_IFC wurde ein analoges Vorgehen angewendet. In Abb. 3.27A sind Stromspuren und Strom-Spannungskennlinien vor und nach Blaulichtbehandlung gezeigt. Es fällt auf, dass Lucifer Yellow keinen Effekt auf die schnelle Inaktivierung hatte. Zudem veränderte

diese Behandlung weder V_m mit -63.1 ± 3.5 mV (davor) und -63.1 ± 4.0 mV (danach) noch k_m mit 11.4 ± 0.6 mV (davor, $n=6$) und 13.3 ± 1.1 mV (danach, $n=5$) signifikant.

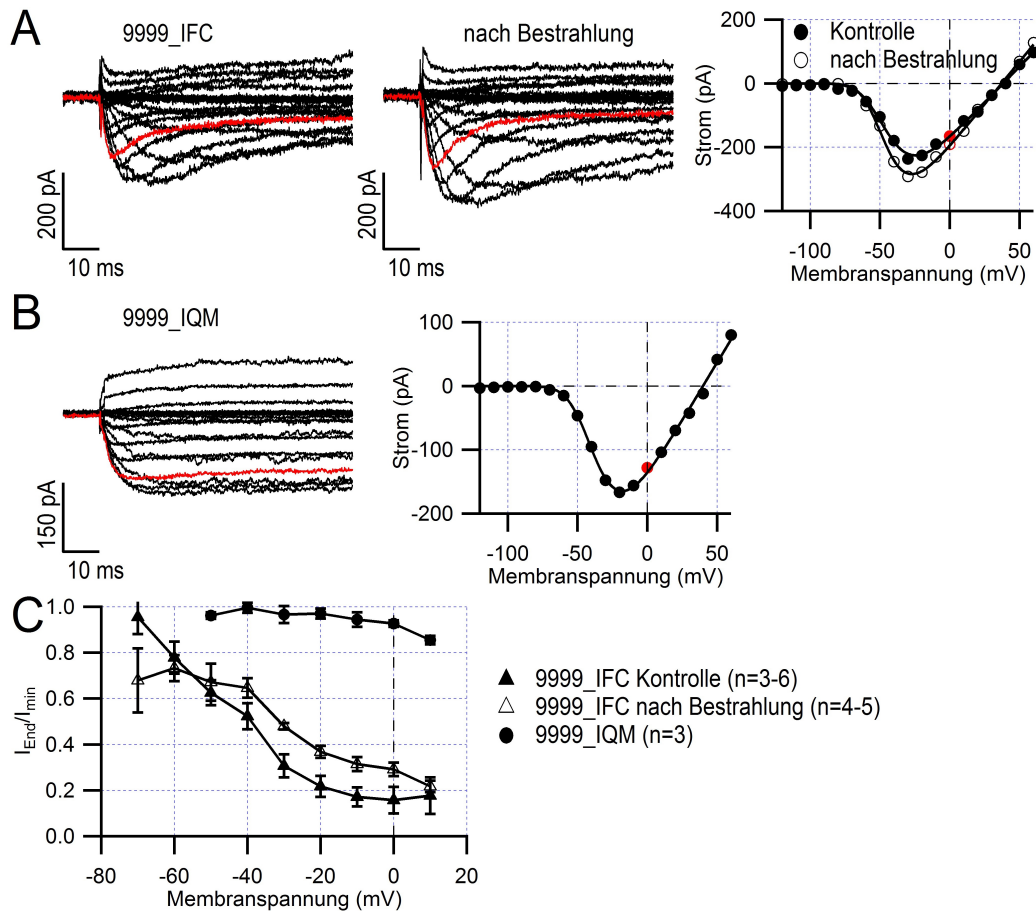


Abbildung 3.27: Die Inaktivierung von $hNav1.9$ ist IFM-vermittelt. **A** Stromantworten und Strom-Spannungskennlinien von 9999_IFC exprimiert in ND7/23-Zellen vor und nach 250 s Bestrahlung mit Blaulicht in Anwesenheit von 200 μ M Lucifer Yellow. **B** Die Mutante 9999_IQM löst in ND7/23-Zellen nichtinaktivierende Na^+ Ströme aus. **C** Verbliebene Stromamplitude des Testpulses nach 70-80 ms Pulsdauer (I_{End}/I_{min}) aufgetragen über der Membranspannung.

Bisher war unklar, ob $hNav1.9$ überhaupt der schnellen Inaktivierung vermittelt durch das IFM-Motiv unterliegt. Zu diesem Zweck wurde die Mutante 9999_IQM exprimiert (Abb. 3.27B). Die Stromabnahme war aufgrund des Glutaminaustausches stark verlangsamt. Die Parameter der Strom-Spannungskurve betragen für V_m -47.0 ± 3.7 mV und für 16.6 ± 1.8 mV. Es wurde die verbliebene Stromamplitude bestimmt (3.27C). Bei 9999_IQM sind zwischen 80 bis 90% der Stromamplitude nach 70 ms Pulsdauer noch erhalten geblieben. Für 9999_IFC zeigt sich ein sichtbarer Anstieg der verbleibenden Stromkomponente um bis zu 20% nach Bestrahlung.

Anhand dieser Resultate wird deutlich, dass auch $hNav1.9$ einer IFM-vermittelten Inaktivierung unterliegt, wenngleich bisher unklar ist, warum 9999_IFC deutlich weniger

empfindlich für oxidative Modifikationen ist als 9999_C4_IFC.

Die Blaulichtbestrahlung von Lucifer Yellow bewirkt eine Freisetzung von reaktiven Spezies, welche Methionine und Cysteine oxidieren können [110]. Die genaue Zusammensetzung der entstehenden reaktiven Spezies ist nicht bekannt. Es wird allerdings postuliert, dass Superoxid-Radikale freigesetzt werden [60]. Zudem wurde gezeigt, dass der Effekt des Inaktivierungsverlusts von Na_v -Kanälen durch DTT verhindert werden kann [58].

Möglicherweise reicht die Modifikation von Cystein zu Cysteinsäure im Inaktivierungsmotiv nicht aus, um die Inaktivierung von 9999_IFC deutlich zu beeinflussen. Daher wurden der Pipettenlösung 200 μM MTSET zugesetzt, welches Cysteine mit einer großen und geladenen Gruppe modifizieren kann [111]. Die Substanz wurde durch 10 min Inkubationszeit in die Zelle überführt.

Als Positivkontrolle wurde 9999_C4_IFC verwendet (Abb. 3.28A), bei der Chimäre trat reproduzierbar ein Inaktivierungsverlust von bis zu 90% auf in 5 unabhängigen Experimenten auf. Für 9999_IFC (Abb. 3.28B) war keine Veränderung der Stromkinetik in 4 unabhängigen Experimenten im Vergleich zu den Messungen mit Lucifer Yellow zu detektieren. Es wird deutlich, dass das Cystein des Inaktivierungsmotivs von 9999_IFC entweder wenig relevant ist für die schnelle Inaktivierung oder in irgendeiner Art und Weise vor oxidativen Modifikationen geschützt wird. Diese Resultate müssen kausal mit dem C-Terminus im Zusammenhang stehen, da dieser der einzige Unterschied zwischen 9999_C4 und 9999 ist.

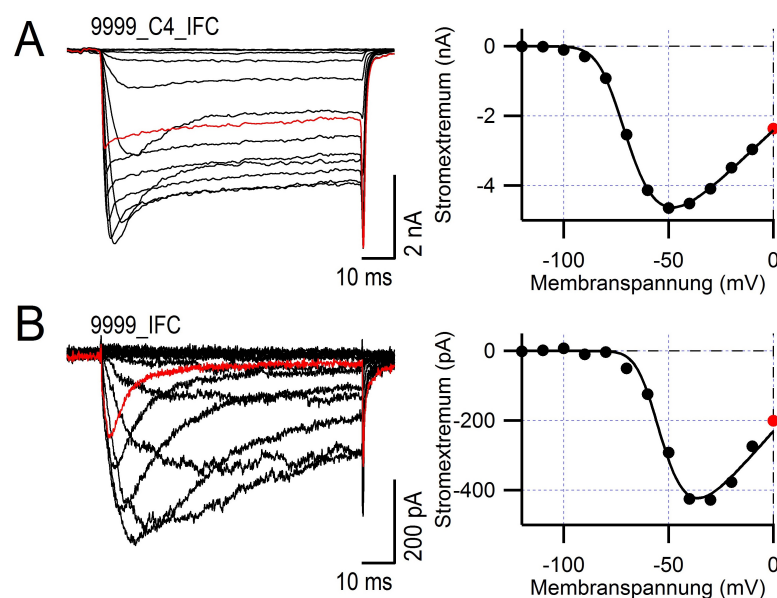


Abbildung 3.28: Intrazelluläres MTSET beeinflusst die schnelle Inaktivierung von 9999_C4_IFC - jedoch nicht von 9999_IFC. **A** Stromantworten von 9999_C4_IFC hervorgerufen durch Depolarisationen auf -120 bis 0 mV in Anwesenheit von 200 μM MTSET. **B** Stromspuren von 9999_IFC hervorgerufen durch Vorgehensweise analog zu A.

Zur weiteren Untersuchung des Effekts von Lucifer Yellow wurde die Gleichgewichts-Inaktivierung für die Kanäle in Anwesenheit von 200 μM Lucifer Yellow vor und nach Bestrahlung mit Blaulicht bestimmt. Es wurde erwartet, dass die oxidative Entfernung der schnellen Inaktivierung von Na_v -Kanälen eine deutliche Veränderung der Gleichgewichts-Inaktivierung bewirkt.

Für 9999_C4_IFC (Abb. 3.29A) zeigt sich, dass Blaulichtbestrahlung die Gleichgewichtsinaktivierung beeinflusst. Der Anteil verbleibenden Stroms vor Bestrahlung ist bei -70 mV Konditionierung bereits auf etwa 30% zurückgegangen, während der verbleibende Strom nach Entfernung der schnellen Inaktivierung noch zu annähernd 100% erhalten ist. Zusätzlich verringert die Entfernung der schnellen Inaktivierung die Amplitude, mit welcher sich die Kanalverfügbarkeit insgesamt verändert, von 80 auf etwa 30%. Das zeigt sich auch anhand der Werte der Anpassungsfunktion. So betragen V_h -89.9 ± 3.5 mV und k_h 12.4 ± 0.8 mV ($n=6$) vor Behandlung sowie nach Behandlung für V_h -49.2 ± 2.4 mV und für k_h 9.2 ± 1.0 mV ($n=4$). Die Entfernung der schnellen Inaktivierung sorgt für eine Verschiebung von V_h um fast 40 mV in depolarisierte Spannungsrichtung, während k_h signifikant um 3 mV verringert wird ($P < 0.05$).

In Abb. 3.29B ist eine Beispielmessung von 9999_IFC analog zu 9999_C4_IFC gezeigt. Anhand der Stromspuren zeigt sich, dass die Konditionierung der Kanäle weder vor noch nach Bestrahlung mit Blaulicht einen Einfluss von unter 10% auf die Kanalverfügbarkeit hat. Die Zusammenfassung aller Verhältnisse aufgetragen über der Konditionierungsspannung zeigt zwei deckungsgleiche Punktverläufe und Anpassungsfunktionen. Das verdeutlicht sich an den Kurvenparametern. Die Ergebnisse betragen für V_h -53.5 ± 1.7 mV und k_h 8.2 ± 0.7 mV ($n=4$) vor Behandlung sowie nach Behandlung für V_h -54.7 ± 3.8 mV und für k_h 8.4 ± 0.6 mV ($n=3$), die sich nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Dahingegen bewirkt die Inaktivierungsdefizienz bei 9999_IQM (Abb. 3.29C), dass eine Konditionierung der Kanäle die Kanalverfügbarkeit über den gesamten Spannungsbereich insgesamt nur um etwa 20% beeinflusst. Daher wurde darauf verzichtet, die Parameter der Anpassungsfunktionen aufzuführen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Gleichgewichts-Inaktivierung durch Entfernung der schnellen Inaktivierung von 9999_C4_IFC oder 9999_IQM deutlich verändert wird. Allerdings bewirkt die oxidative Behandlung von 9999_IFC keine Veränderung dieser Eigenschaft.

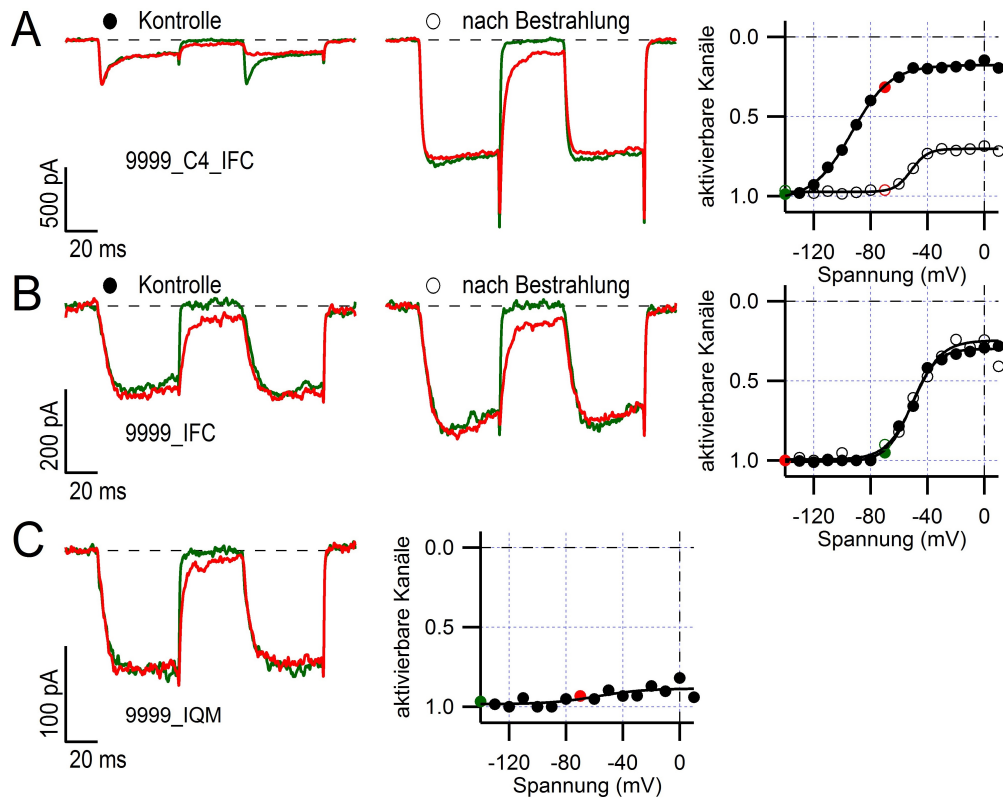


Abbildung 3.29: Lucifer Yellow verändert Gleichgewichts-Inaktivierung von 9999_IFC in ND7/23-Zellen nicht. **A** Stromspuren bei -140 und -70 mV Konditionierung sowie Anpassungsfunktionen angepasst an die Kanalverfügbarkeiten von 9999_C4_IFC. Gezeigt sind Stromantworten vor und nach Bestrahlung mit Blaulicht. **B** Analoge Vorgehensweise für 9999_IFC. **C** Gleichgewichts-Inaktivierung der Mutante 9999_IQM wurde in Abwesenheit von Lucifer Yellow bestimmt.

Anhand der Parameter der Strom-Spannungskennlinien (Abb. 3.30A+B) zeigt sich, dass Lucifer Yellow keine signifikanten Veränderungen von V_m auslöst ($P > 0.05$) und sich k_m nur bei 9999_C4_IFC signifikant verändert ($P < 0.05$). Hinsichtlich der Gleichgewichts-Inaktivierung (Abb. 3.30C+D) löst Lucifer Yellow lediglich bei 9999_C4_IFC eine signifikante Veränderung von V_h ($P < 0.001$) und k_h aus ($P < 0.05$). Durch die Entfernung der schnellen Inaktivierung nähern sich V_h und k_h von 9999_C4_IFC dem Kanal 9999 an. Das lässt die Vermutung zu, dass die Gleichgewichts-Inaktivierung von 9999 zumindest teilweise IFM-unabhängig abläuft.

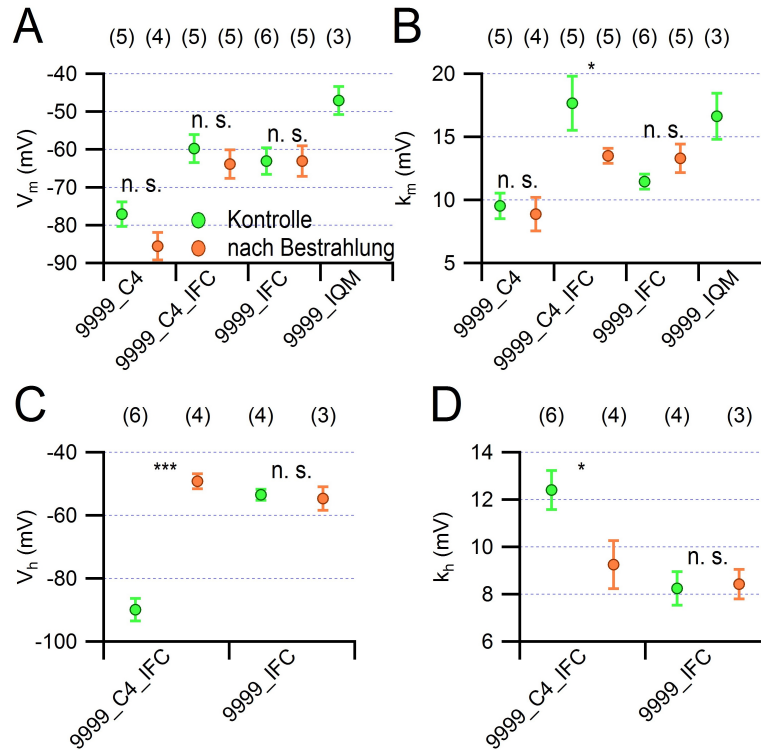


Abbildung 3.30: Die Effekte von Lucifer Yellow auf Strom-Spannungskennlinie und Gleichgewichts-Inaktivierung von Nav -Kanälen untersucht in ND7/23-Zellen. **A-B** Parameter der Strom-Spannungskennlinie V_m (A) und k_m (B). Grüne Punkte zeigen Kontrollwerte vor Bestrahlung und braune Punkte Werte nach Bestrahlung mit Blaulicht. **C-D** Parameter der Gleichgewichts-Inaktivierung V_h (C) und k_h (D).

3.3.4 Deaktivierung von Nav -Kanälen

Die Untersuchung der Deaktivierungs-Kinetik erfolgte durch die Aufnahme von Tailströmen, an welche Anpassungskurven nach Gleichung 2.5 angenähert wurden. In Abb. 3.31A sind Stromantworten für die darüber skizzierten Pulsprotokolle von 9999_C4 sowie 9999_C4_IFC nach Entfernung der schnellen Inaktivierung bei -80 (violett) und -60 mV (blau) Deaktivierungsspannung gezeigt. Es wird einerseits deutlich, dass die Entfernung der schnellen Aktivierung eine Vergrößerung des persistierenden Stroms bei -60 mV bewirkte, wenngleich sich andererseits die Geschwindigkeitskonstante der Tailstromabnahme τ_{deact} nur bei -120 und -115 mV signifikant verlangsamte ($n=5$, $n=7$, $P<0.05$) und bei allen anderen Spannungen war zumindest tendenziell eine Verlangsamung von 5 bis zu 50% zu detektieren.

Die für 9999_IFC gezeigten Stromspuren (Abb. 3.31B) bei Deaktivierungsspannungen von -70 (grün) und -80 mV (violett) unterscheiden sich vor und nach Bestrahlung mit 450-490 nm Blaulicht von der Kinetik nicht. Es wurden keine signifikanten Unterschiede

für die Werte von τ_{deact} vor und nach Bestrahlung bei allen Spannungen ermittelt ($n=5$, $n=4$, $P>0.05$).

In Abb. 3.31C werden die Tailströme von 9999 und 9999_IQM verglichen. Auch diese sehen von der Kinetik vergleichbar aus, wenngleich die τ_{deact} -Werte von 9999_IQM signifikant um bis zu 70% niedriger sind als von 9999 ($n=11-12$, $n=3$, $P<0.01$).

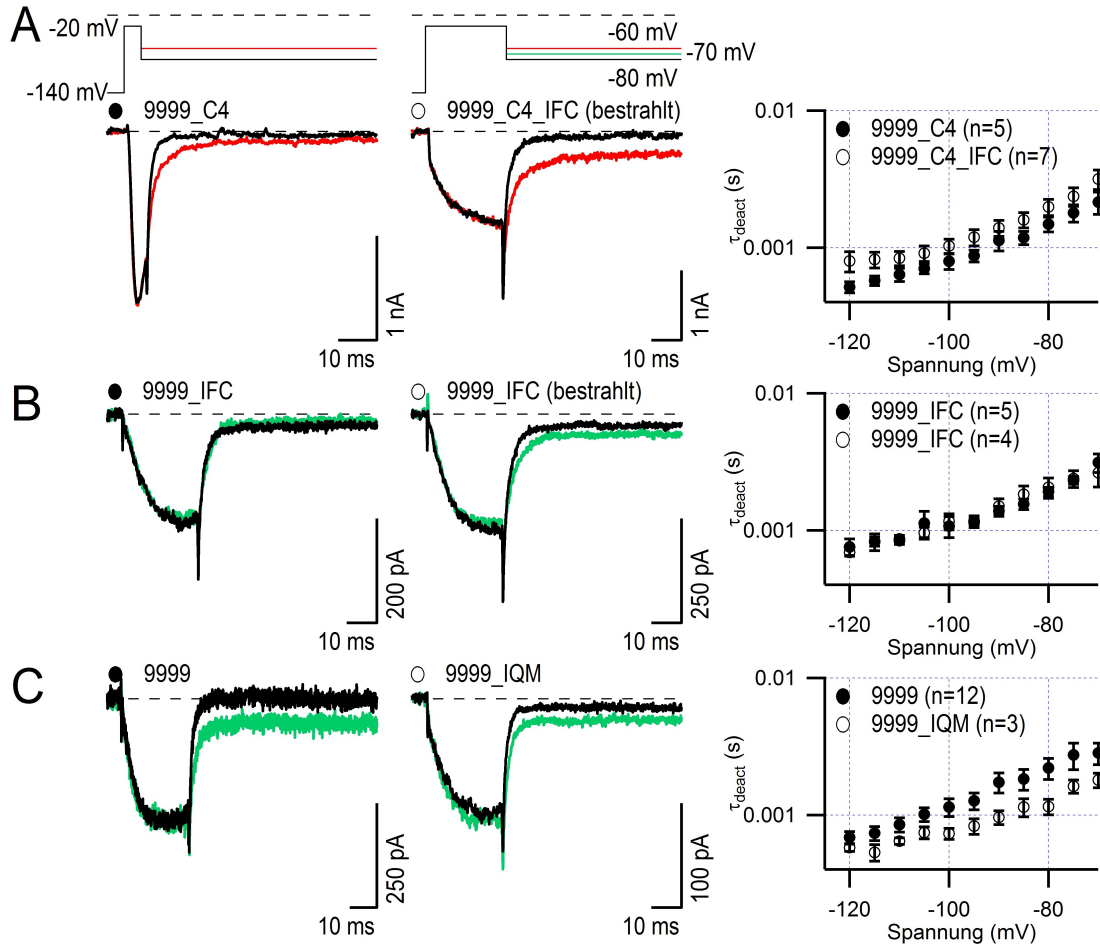


Abbildung 3.31: Die Deaktivierung von 9999_IFC verändert sich nach Bestrahlung mit Blaulicht nicht. **A** Stromspuren bei -80 (schwarz) und -60 mV (rot) Deaktivierungsspannung von 9999_C4 und 9999_C4_IFC nach Entfernung der schnellen Inaktivierung. Pulsprotokoll ist oben gezeigt. Werte von τ_{deact} über Deaktivierungsspannung aufgetragen. **B** Stromspuren bei -80 (schwarz) und -70 mV (grün) Deaktivierungsspannung von 9999_IFC vor und nach Bestrahlung mit Blaulicht analog zu A. **C** Stromspuren bei -80 (schwarz) und -70 mV (grün) Deaktivierungsspannung von 9999 und 9999_IQM analog zu B.

Somit zeigt sich, dass die Entfernung der schnellen Inaktivierung durch reaktive Spezies die Deaktivierung von 9999_IFC nicht verändert und von 9999_C4_IFC nur geringfügig verlangsamt. Allerdings ist die Deaktivierung von 9999_IQM sogar schneller als von 9999. Die Verlangsamung der Deaktivierung ist vermutlich auch auf die Vergrößerung des persis-

tierenden Stroms bei 9999_C4_IFC zurückzuführen, wohingegen die Beschleunigung der Deaktivierung von 9999_IQM auf die um 15-20 mV in depolarisierte Spannungsrichtung verschobene Kanalinaktivierung hindeutet.

3.3.5 TEVC- und Patch-Clamp-Resultate unterscheiden sich aufgrund der F^- -Sensitivität von $hNa_v1.9$

Die Parameter der Strom-Spannungskennlinie Chimäre 9999_C4 von TEVC-Messungen unterscheiden sich deutlich von den in ND7/23-Zellen gemessenen Resultaten. Es ist bekannt, dass intrazelluläres F^- deutliche Auswirkungen auf die Spannungsabhängigkeit von $Na_v1.9$ hat [79]. Zur Untersuchung der F^- -Wirkung auf $hNa_v1.9$ -Kanäle wurde die Chimäre 9999_C4 in HEK293T-Zellen exprimiert.

Zunächst wurde gezeigt, dass 9999_C4 in HEK293T-Zellen funktionell exprimiert werden kann (Abb. 3.32A). Die gemessenen Parameter V_m und k_m für 9999_C4 unterscheiden sich nicht signifikant von den Resultaten aus ND7/23-Zellen und die Ströme waren auch von vergleichbarer Kinetik. Durch die Veränderung der internen Fluoridkonzentration mit den Lösungen IL1 (0 mM F^- , Abb. 3.32B) und IL2 (30 mM F^- , Abb. 3.32C) veränderte sich die Kinetik der gemessenen Ströme nicht, aber sichtbare Stromereignisse traten erst bei höheren Membranspannungen auf.

Beim Vergleich der um das Diffusionspotential korrigierten Parameter für Strom-Spannungskennlinie (Abb. 3.32D-E) fällt auf, dass intrazelluläres F^- V_m um fast 40 mV in den hyperpolarisierten Bereich verschiebt. Allerdings scheint auch eine niedrige F^- -Konzentration von 30 mM bereits eine Verschiebung von V_m um 15 mV in hyperpolarisierte Spannungsrichtung auszulösen. Durch F^- wird k_m um etwa 6 mV kleiner, die Spannungsabhängigkeit der Kanäle wird also größer.

Die Gleichgewichts-Inaktivierung (Abb. 3.32F-G) wird dabei durch F^- allerdings weniger stark beeinflusst. Während 30 mM F^- weder V_h noch k_h signifikant verändern, bewirken 105 mM F^- eine Verschiebung von V_h um fast 15 mV in hyperpolarisierte Spannungsrichtung, während k_h nur um knapp 2 mV ansteigt.

Das zeigt, dass die Wirkung von F^- nicht in gleichem Umfang die Aktivierung und Inaktivierung der Kanäle beeinflusst. Während die Aktivierung sehr deutlich in hyperpolarisierte Spannungsrichtung verschoben wird und die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung in Anwesenheit von F^- größer wird, ist die Gleichgewichts-Inaktivierung nur bei 105 mM F^- signifikant verändert. Außerdem wird durch 105 mM F^- die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung schwächer.

Es ist möglich, die Ergebnisse der Patch-Clamp-Experimente mit den TEVC-Messungen zu vergleichen. Auch wenn in Abwesenheit von F^- die Differenzen von V_m und k_m je 7 mV betragen, scheinen die in Patch-Clamp-Messungen vorgenommenen Veränderungen des intrazellulären Milieus für einen Großteil des Unterschiedes verantwortlich zu sein. Es

lässt sich also auch zeigen, dass die F^- -Modulation von $hNa_V1.9$ -Strömen in der Chimäre 9999_C4 erhalten geblieben ist.

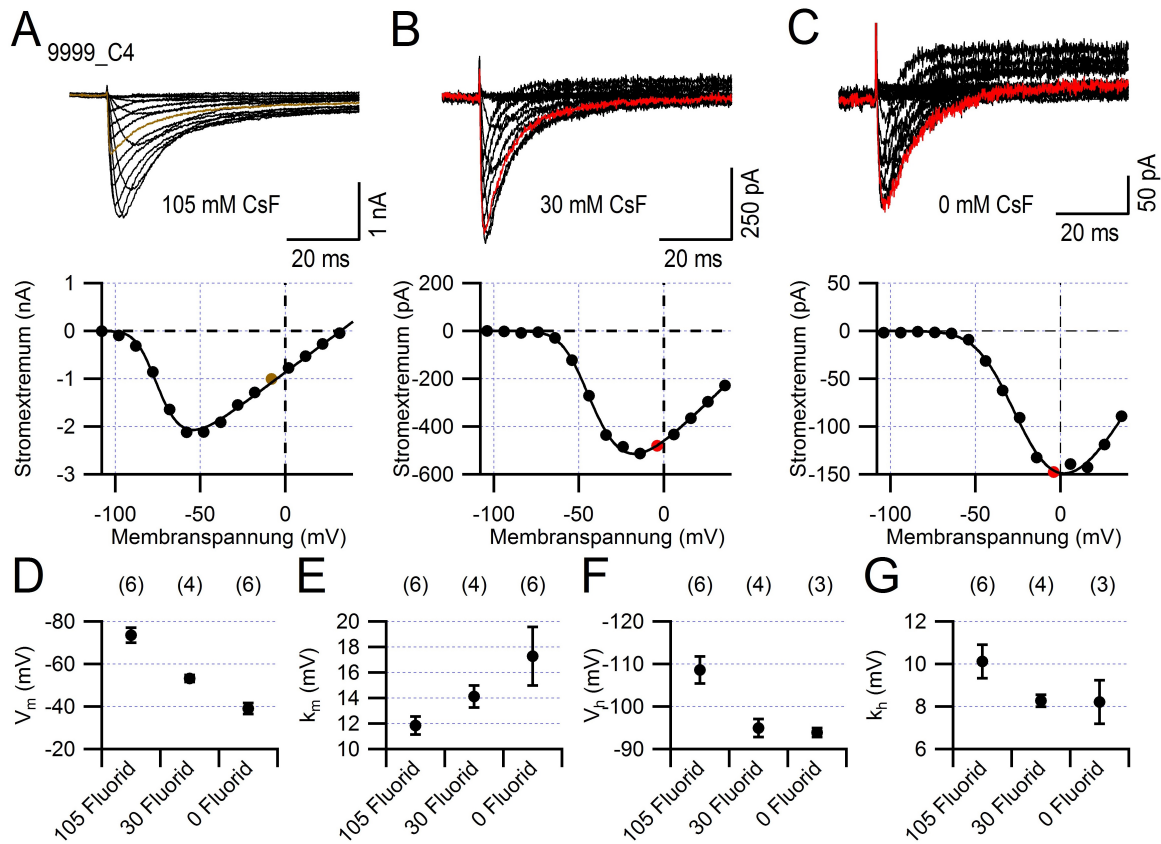


Abbildung 3.32: Die Chimäre 9999_C4 wird durch intrazelluläres F^- beeinflusst. **A-C** Stromspuren und Stromspannungskennlinie von 9999_C4 exprimiert in HEK293T-Zellen mit 105 mM F^- (A), 30 mM F^- (B) und 0 mM F^- (C) in der Pipettenlösung. Stromspur bei -8 mV braun und Stromspuren bei -4 mV in rot hervorgehoben. **D-E** Parameter der Strom-Spannungskennlinien V_m (D), k_m (E). **F - G** Parameter der Gleichgewichts-Inaktivierung V_h (F), k_h (G).

Aus der Literatur war bekannt, dass 30 mM intrazelluläres F^- keinen signifikanten Einfluss auf die Strom-Spannungskennlinie und Gleichgewichts-Inaktivierung von $Na_V1.8$ -Strömen in Ratten-DRG-Neuronen hat, während $Na_V1.9$ -Ströme in DRG-Neuronen und enterischen Neuronen stark modifiziert werden [79]. Für Kontrollmessungen wurden daher die Veränderungen von 4444_YS-Strömen in Abhängigkeit von der intrazellulären F^- -Konzentration bestimmt (Abb. 3.33).

Repräsentative Stromspuren mit Strom-Spannungskennlinie wurden unter Verwendung von Pipettenlösungen mit 105 mM F^- (Abb. 3.33A), 30 mM F^- (Abb. 3.33B), 0 mM F^- und 0 mM Ca^{2+} (Abb. 3.33C) sowie 0 mM F^- -frei und 55 nM Ca^{2+} (Abb. 3.33D) aufgenommen. Die Kinetik der Stromereignisse ist trotz unterschiedlicher Lösungen vergleichbar.

Die Parameter der Strom-Spannungskennlinie (Abb. 3.33E-F) schwanken für V_m um

bis zu 17 mV (105 mM F^- verglichen mit F^- - und Ca^{2+} -freier Lösung). Zwischen Strom-Spannungskennlinien bei Anwesenheit von 30 mM und 0 mM F^- besteht kein signifikanter Unterschied für V_m . Die Werte für k_m steigen mit sinkender F^- -Konzentration signifikant insgesamt um knapp 3 mV an.

In Anwesenheit von 105 mM intrazellulärem F^- wird der Parameter V_h (Abb. 3.33G) der Gleichgewichts-Inaktivierung signifikant um etwa 14 mV in hyperpolarisierte Richtung verschoben, während sich V_h bei 30 mM F^- nicht signifikant verändert. Der Parameter k_h (Abb. 3.33H) schwankt bei allen verwendeten Lösung nur um insgesamt 1 mV.

Damit sind die F^- -bedingten Veränderungen der Strom-Spannungskennlinie und Gleichgewichts-Inaktivierung von 4444_Ys vergleichbar mit der von 44(94)4.

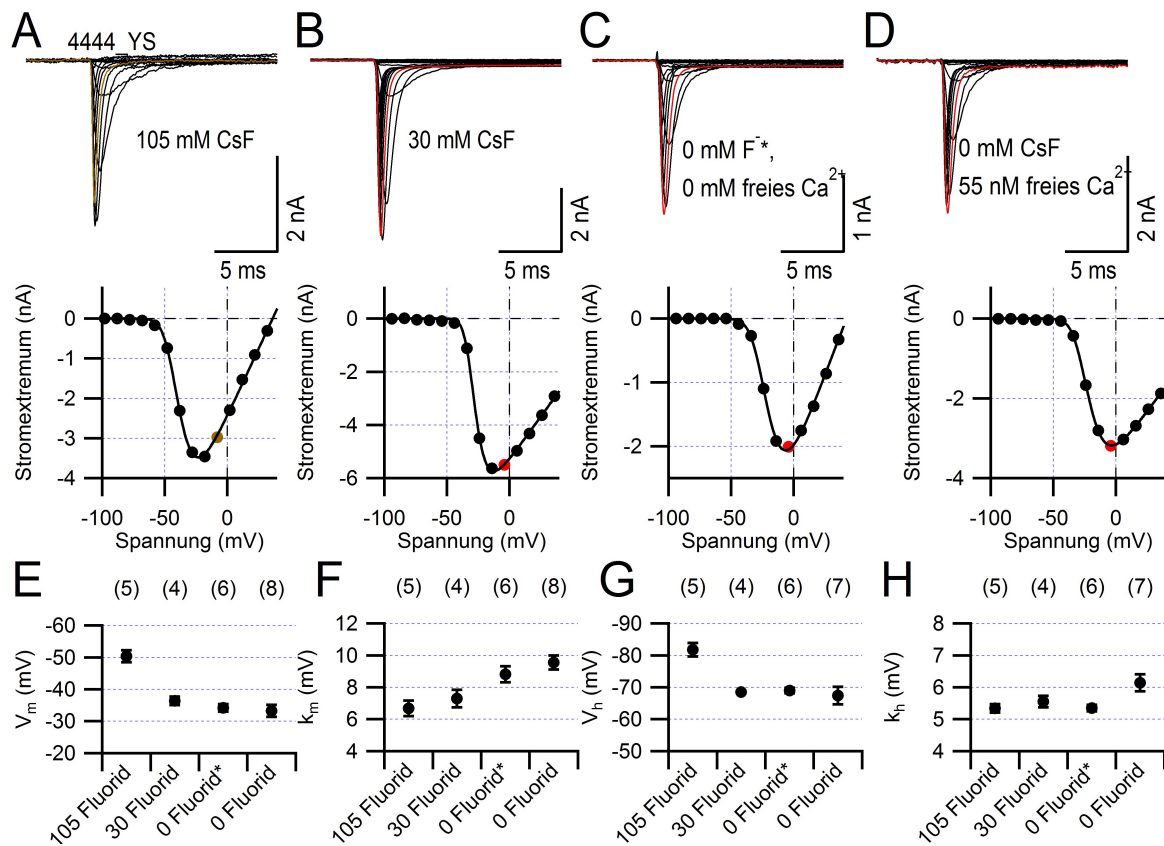


Abbildung 3.33: Der NaV-Kanal 4444_Ys wird durch intrazelluläres F^- beeinflusst. **A-D** Stromspuren und Stromspannungskennlinie von 4444_Ys exprimiert in HEK293T-Zellen mit 105 mM F^- -haltiger (A), F^- - und Ca^{2+} -freier (B) und F^- -freier und physiologisch Ca^{2+} -gepufferter Pipettenlösung. Stromspur bei -8 mV braun und Stromspuren bei -4 mV in rot hervorgehoben. **D - E** Parameter der Strom-Spannungskennlinien V_m (D), k_m (E). **F-G** Parameter der Gleichgewichts-Inaktivierung V_h (F), k_h (G).

3.4 Einfluss von hNa_v1.9 auf das Schmerzempfinden

3.4.1 Die Mutation L811P untersucht in *Xenopus*-Oozyten

Die SCN11A-Mutation, durch welche Leucin 811 zu Prolin verändert wird, steht im Zusammenhang mit Analgesien bei zwei Patienten. Das war zunächst überraschend, da bisher keine bekannten SCN11A-Mutationen funktionell untersucht waren. Auch aus SCN11A^{-/-}-Mäusen war bereits bekannt, dass ein Mangel an Na_v1.9-Kanälen keine großen Auswirkungen auf das Schmerzempfinden der Mäuse hat [135]. Dieser interessante Sachverhalt machte es erforderlich die Mutation in elektrophysiologischen Messungen zu untersuchen.

In *Xenopus*-Oozyten wurden 9999_C4 (Abb. 3.34A) sowie 9999_C4_L811P (Abb. 3.34B) funktionell exprimiert. Die Strom-Spannungskennlinien sind in Abb. 3.34C aufgeführt. Die Mittelwerte der daraus gewonnenen Parameter sind in Abb. 3.34D aufgetragen. Für V_m zeigt sich, dass die Unterschiede zwischen 9999_C4 mit -36.9 ± 1.9 mV und 9999_C4_L811P -66.3 ± 1.5 mV signifikant sind ($P < 0.001$) und dass der Abstand mit etwa 30 mV auch ungefähr in dem Bereich liegt, der sich für L799P *knock in*-Mäuse bzw. Wildtypmäuse ergab [45]. Die Werte für k_m unterscheiden sich mit 17.2 ± 1.7 mV für 9999_C4 und 20 ± 0.8 mV für 9999_C4_L811P nicht signifikant. Außerdem ist das Umkehrpotential mit 7.8 ± 1.4 mV ($n=8$) bei der Mutante L811P stark verschoben.

Zur weiteren Charakterisierung wurden Inaktivierungszeitkonstanten τ_h (Gleichung 2.6) bestimmt. In Abb. 3.34E sind die Mittelwerte für 9999_C4_L811P und 9999_C4 aufgeführt. Es fällt auf, dass nur die Resultate bei vier Membranspannungen aufgrund der stark variierenden Spannungsabhängigkeiten überlappen und verglichen werden können. Auffallend ist jedoch, dass die Zeitkonstanten für 9999_C4_L811P und 9999_C4 signifikant verschieden sind und dass die Inaktivierung von 9999_C4 signifikant schneller ist ($P < 0.001$).

Das stark verschobene Umkehrpotential von 9999_C4_L811P warf die Frage auf, ob die Mutation eine Veränderung der Poreneigenschaften hervorruft. Daher wurden 100 nM TTX bei Messungen von 9999_C4_L811P- bzw. 9999_C4_L811P_SY appliziert. Während die Anwesenheit von 100 nM TTX bei 9999_C4_L811P (Abb. 3.34F) keine Einstrominhibierung hervorrief, kann 9999_C4_L811P_SY (Abb. 3.34G) durch 100 nM TTX zu etwa 90% geblockt werden. Diese Beobachtungen konnten mit je $n=4$ unabhängigen Experimenten bestätigt werden.

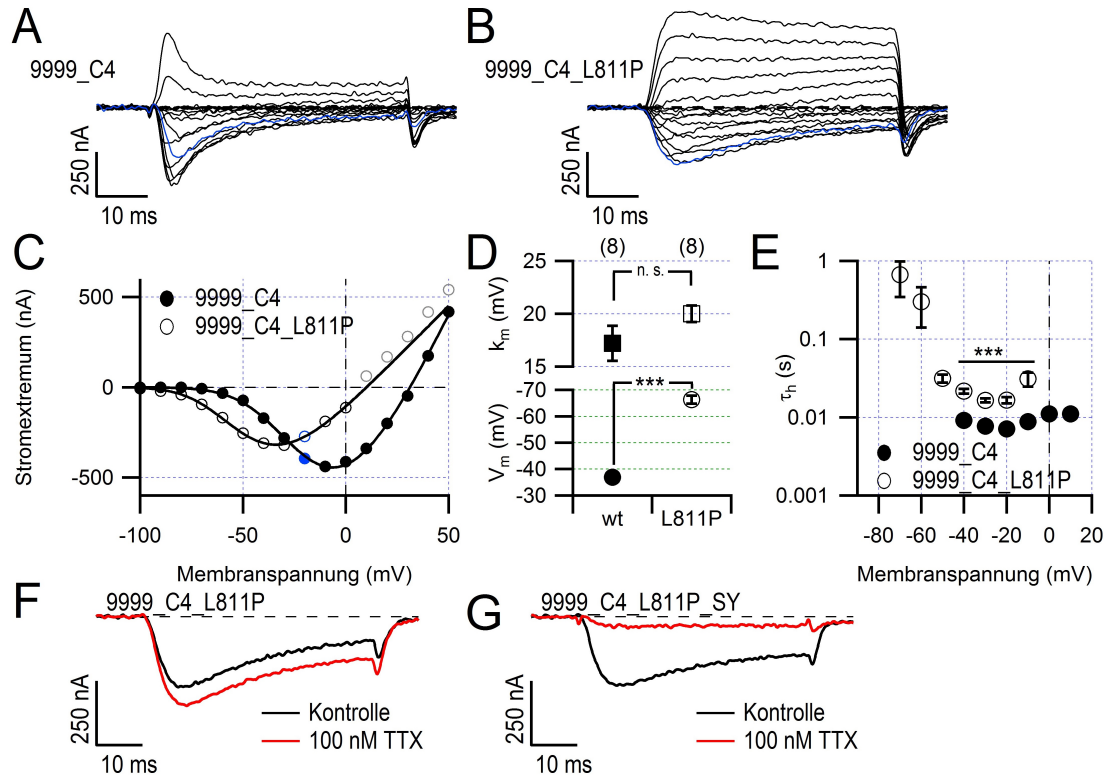


Abbildung 3.34: Die Mutation L811P verändert Eigenschaften von 9999_C4 in *Xenopus*-Oozyten. **A-B** Stromspuren von 9999_C4 (A) bzw. 9999_C4_L811P (B). Stromantworten der Zellen bei -20 mV sind blau hervorgehoben. **C** I(V)-Kennlinien aus A (ausgefüllte Kreise) und B (leere Kreise). Messpunkte in grau wurden für Anpassung nicht berücksichtigt. **D** V_m (unten) unterscheidet sich signifikant bei beiden Kanälen, aber k_m (oben) unterscheidet sich nicht signifikant. **E** Inaktivierungszeitkonstante τ_h für 9999_C4 (ausgefüllte Kreise) bei -40 bis 10 mV und für 9999_C4_L811P (leere Kreise) bei -80 bis 10 mV. Signifikante Unterschiede bei den Membranspannungen -40 bis -10 mV. **F** Testpulse auf -40 mV für 50 ms von 9999_C4_L811P vor (schwarz) und nach (rot) Applikation von 100 nM TTX. Keine Inhibierung des Einstroms durch 100 nM TTX. **G** Analoge Vorgehensweise zu F mit 9999_C4_L811P_SY führte zu etwa 90% Einstrominhibierung.

Die Chimäre 9999_C4 ist ein gutes Hilfsmittel, um hNa_v1.9-Mutanten in *Xenopus*-Oozyten heterolog zu exprimieren. Weiterhin konnte auch gezeigt werden, dass die Mutation L811P zu einer Verlangsamung der Kanalinaktivierung im Vergleich zu 9999_C4 führt. Die äußere Pore ist in ihrer TTX-Sensitivität nicht verändert. Vielmehr scheint die Verschiebung des Umkehrpotentials wohl durch eine Veränderung der intrazellulären Na⁺-Konzentration ausgelöst zu werden.

3.4.2 Die hNav1.9-Mutante L811P untersucht in ND7/23-Zellen

Die Daten aus *Xenopus*-Oozyten stellen dar, dass die Mutation L811P große Änderungen der Schalteigenschaften von 9999_C4 auslöst, welche auch mit den Ergebnissen der *knock-in*-Mäuse vergleichbar sind. In Patch-Clamp-Experimenten wurde überprüft, inwieweit die Daten aus *Xenopus*-Oozyten reproduziert und auf Wildtypkonstrukt 9999 bzw. 9999_L811P übertragbar sind. Entsprechende Experimente wurden analog zu Abschnitt 3.3.1 durchgeführt.

Der Vergleich von Stromspuren der Kanäle 9999 und 9999_L811P (Abb. 3.35A) zeigen deutliche Unterschiede. Vielmals sind Stromänderungen von 9999_L811P bereits ab Depolarisationen auf -110 mV (bei einigen Zellen auch bereits bei -120 mV) erkennbar, während diese beim Wildtyp erst ab -90 mV gemessen werden können. Außerdem ist die Kinetik der Kanalmutante deutlich langsamer als 9999, da aufgenommene Stromsignale eine viel langsamere Stromabnahme innerhalb des 80 ms-Pulses zeigen. Im direkten Vergleich verblieb selbst bei 0 mV ein größerer Anteil persistierenden Stroms (Abb. 3.35D). Die Strom-Spannungskennlinie von 9999_L811P ist mit einem V_m -Wert von -86.9 ± 2.8 mV im Vergleich zu 9999 um mehr als 23 mV in den hyperpolarisierten Bereich verschoben, während k_m mit 11.9 ± 0.8 mV nur knapp 2 mV kleiner als bei 9999 ist ($n=11$).

Für die Chimäre 9999_C4 sind die Auswirkungen der Mutation L811P in ND7/23-Zellen ebenfalls gravierend (Abb. 3.35B). Wie bei 9999_L811P waren bei einigen Zellen bereits ab -120 mV sichtbare Stromantworten zu detektieren. In den Strom-Spannungskennlinien äußert sich der Effekt der Mutation durch eine 27 mV-Verschiebung von V_m in hyperpolarisierte Spannungsrichtung auf -96.0 ± 1.8 mV ($n=7$); die k_m -Werte unterscheiden sich mit 11.8 ± 0.6 mV für den Wildtyp und 11.9 ± 1 mV für die Mutante nicht voneinander. Während die Stromamplitude der Chimäre 9999_C4 innerhalb von 80 ms wieder auf unter 10% absinkt, ist die schnelle Inaktivierung der Mutante 9999_C4_L811P sichtbar verlangsamt (Abb. 3.35D).

Um zu überprüfen, ob die L811P-Mutation den Inaktivierungslinker behindert, wurden 9999_C4_L811P_IFC-Kanäle vor und nach Entfernung der schnellen Inaktivierung (analog zu Abschnitt 3.3.3, Abb. 3.35C) funktionell untersucht. Die Bestrahlung mit Blaulicht führte reproduzierbar zu einer Verlangsamung der Kanalinaktivierung, wenngleich auch eine deutliche Einstromverringerung beobachtet wurde. Dabei hatte die Entfernung der schnellen Inaktivierung weder auf V_m mit vorher -86.4 ± 2.3 mV und danach -93.4 ± 2.6 mV noch auf k_m mit davor 15.7 ± 0.8 mV und danach 13.6 ± 0.6 mV signifikante Auswirkungen ($n=5$ bzw. $n=6$). Allerdings sorgte die Bestrahlung in mehreren Fällen für eine deutliche Verschlechterung des Membranwiderstands, was vermutlich auf eine erhöhte Kanalaktivität im Bereich des Haltepotentials zurückgeführt werden kann.

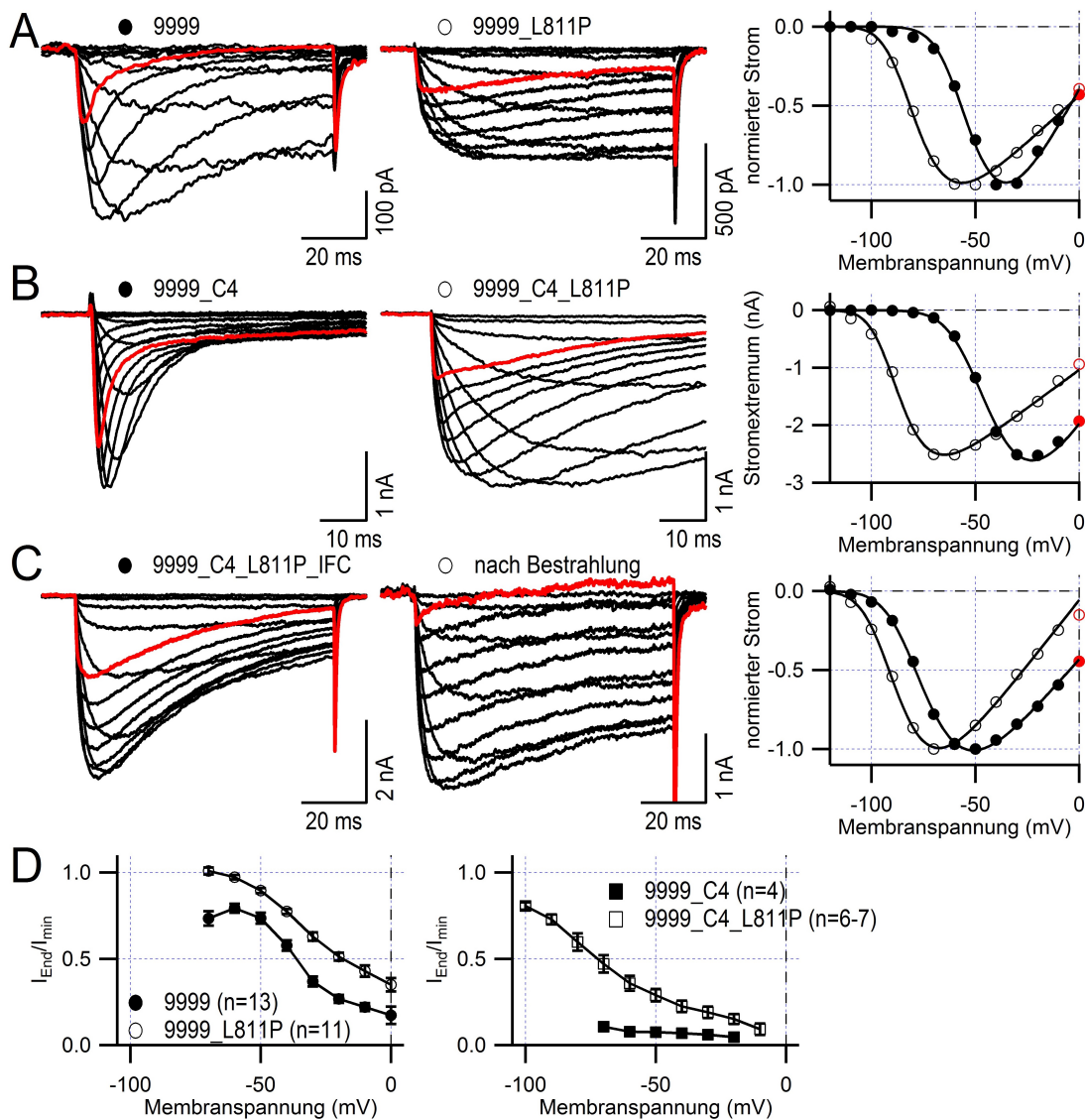


Abbildung 3.35: Die Mutation L811P bewirkt einen deutlichen *gain-of-function* von hNav1.9-Kanälen in ND7/23-Zellen. **A** Stromspuren von 9999 und 9999_L811P ausgehend von einem Haltepotential bei -140 mV auf Membranspannungen von -120-0 mV. Strom-Spannungskennlinien der Stromextrema aufgetragen über Membranspannung für 9999 gefüllte Kreise und für 9999_L811P leere Kreise sind rechts abgebildet. **B** Analoge Vorgehensweise für 9999_C4 und 9999_C4_L811P. **C** Analoge Vorgehensweise für 9999_C4_L811P_IFC vor und nach Bestrahlung mit Blaulicht in Anwesenheit von 200 μ M Lucifer Yellow. **D** Verbliebene Stromamplituden von 9999, 9999_L811P, 9999_C4 und 9999_L811P bei angezeigter Membranspannung.

Während die Mutation L811P die Kanalaktivierung vergleichbar veränderte, wurde die Gleichgewichts-Inaktivierung von 9999- oder 9999_C4-Kanälen unterschiedlich beeinflusst. Für V_h ergaben sich keine signifikant verschiedenen Werte ($P > 0.05$) für 9999 mit -56.9 ± 0.6 mV ($n=8$) und mit -54.4 ± 1.4 mV ($n=9$) für die Mutante. Jedoch beträgt k_h der Mutante 15.7 ± 1.4 mV und damit fast das Doppelte des Wildtyps, für welchen k_h bei 8.9 ± 0.5 mV ermittelt wurde (Abb. 3.36A). Diese Resultate stehen in vollkommenem Gegensatz zu den Ergebnissen, welche in mDRG-Neuronen gemessen wurden. Dort war die Gleichgewichts-Inaktivierung zwischen Mutante und Wildtyp ebenfalls um etwa 28 mV in den hyperpolarisierten Spannungsbereich verschoben [45]. Das bedeutet, dass die mutierten Kanäle im Menschen bei Ruhemembranpotential potentiell aktiver sein könnten. Damit lässt sich möglicherweise auch erklären, warum die Analgesie in L799P-Mäusen vergleichsweise mild im Vergleich zu den Patienten ausfällt.

Im Gegensatz dazu bewirkte die L811P-Mutation bei 9999_C4 eine deutliche Verschiebung von V_h um etwa 22 mV in hyperpolarisierte Spannungsrichtung auf -123.5 ± 1.4 mV, während sich k_h für den Wildtyp mit 10.4 ± 0.6 mV ($n=10$) und für die Mutante mit 10.4 ± 0.6 mV ($n=6$) nicht signifikant unterscheiden (Abb. 3.36B, $P > 0.05$).

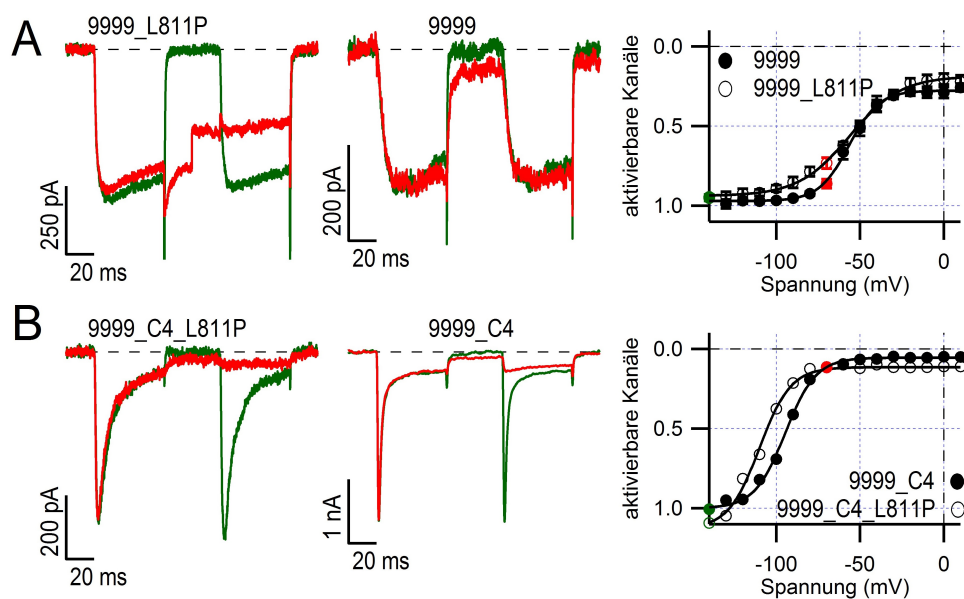


Abbildung 3.36: Die Mutation L811P beeinflusst die Gleichgewichts-Inaktivierung von 9999 und 9999_C4 unterschiedlich. **A** Stromantworten von 9999 und 9999_L811P bei Konditionierungsspannungen von -140 (grün) und -70 mV (rot). Anteile aktivierbarer Kanäle sind über der Konditionierungsspannung aufgetragen und durch Boltzmann-Anpassung charakterisiert. **B** Analoge Vorgehensweise für 9999_C4 und 9999_C4_L811P.

Beim Vergleich des Parameters V_m (Abb. 3.37A) wird deutlich, dass die Mutation L811P die Kanalaktivierung sowohl von 9999 als auch von 9999_C4 um über 23 mV in den hyperpolarisierten Spannungsbereich verschiebt, während k_m nicht signifikant vari-

iert (Abb. 3.37B, $P > 0.05$). Das Umkehrpotential E_{rev} beträgt für 9999_L811P lediglich etwa 35 mV und für 9999_C4_L811P weniger als 30 mV (Abb. 3.37C). Es ist nicht davon auszugehen, dass die Selektivität durch die Mutation verändert wird, da bei einigen Messungen Werte um 40 mV erhalten wurden. Vielmehr müssen Leckströme und das ungewöhnliche Öffnungsverhalten als Ursachen angesehen werden.

Die Parameter der Gleichgewichts-Inaktivierung V_h und k_h (Abb. 3.37D-E) werden durch die Mutation L811P bei 9999 und 9999_C4 unterschiedlich beeinflusst. Während bei 9999_L811P lediglich k_h deutlich größer ist als beim Wildtyp, ist bei 9999_C4_L811P V_h um 22 mV verschoben. An den Differenzen der Werte V_m und V_h wird noch einmal deutlich, dass sich die Mutation bei 9999_L811P nur auf V_m auswirkt, aber bei 9999_C4_L811P V_m und V_h im Vergleich zu 9999_C4 verschoben sind (Abb. 3.37F).

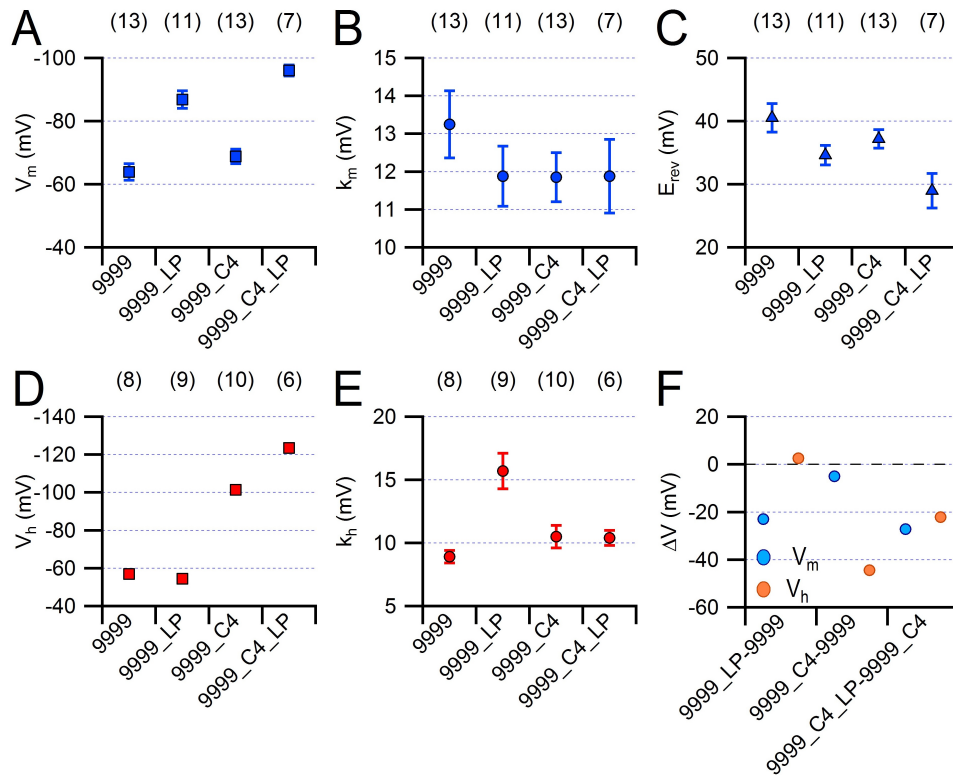


Abbildung 3.37: Die Parameter von Strom-Spannungskennlinie und Gleichgewichts-Inaktivierung der L811P-Mutanten verglichen mit ihren jeweiligen Wildtypkonstrukten. **A-C** Parameter der Strom-Spannungskennlinie V_m (A), k_m (B) und E_{rev} (C). **D-E** Parameter der Gleichgewichts-Inaktivierung V_h (D) und k_h (E). **F** Veränderungen der Werte für V_m und V_h der Kanäle im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp.

Die Kinetik der Deaktivierung unterscheidet sich deutlich zwischen L811P-Mutanten und den Wildtypkonstrukten. Während die Tailstromabnahme für 9999_C4 bei beiden gezeigten Deaktivierungsspannungen in Abb. 3.38A bereits innerhalb des gezeigten Zeitbereichs abgeschlossen ist, verläuft diese für 9999_C4_L811P sichtbar langsamer. Die

Deaktivierungszeitkonstanten unterscheiden sich im direkten Vergleich zwischen $516 \pm 48 \mu\text{s}$ zu $1.4 \pm 0.06 \text{ ms}$ (-120 mV) und $4.3 \pm 0.7 \text{ ms}$ zu $21.1 \pm 3.5 \text{ ms}$ (-60 mV) um das Zwei- bis Fünffache. Die Zeitkonstante von 9999_C4_L811P bei -120 mV wird von 9999_C4 erst bei einer Deaktivierungsspannung von -85 mV erreicht - also 35 mV depolarisiert davon.

Die Entfernung der schnellen Inaktivierung von 9999_C4_L811P_IFC vergrößert den persistierenden Anteil des Tailstroms (Abb. 3.38B), aber die Zeitkonstanten der Deaktivierung unterscheiden sich vor und nach Bestrahlung mit Blaulicht nicht signifikant voneinander.

Wie bei 9999_C4_L811P vergrößert sich bei 9999_L811P der Anteil persistierenden Stroms deutlich im Vergleich zu 9999. Während bei 9999 eine deutliche Stromabnahme mit einer maximalen Komponente von 10% persistierenden Stroms bei einer Deaktivierungsspannung von -70 mV verbleibt, ist bei 9999_L811P bei -70 mV keine Deaktivierung mehr messbar. Die Zeitkonstanten unterscheiden sich im direkten Vergleich bei gleichen Deaktivierungsspannungen mit $686 \pm 69 \mu\text{s}$ zu $1.4 \pm 0.2 \text{ ms}$ (-120 mV) und $2.8 \pm 0.5 \text{ ms}$ zu $22.7 \pm 10.4 \text{ ms}$ (-70 mV) um das Zwei- bis Achtfache. Die Zeitkonstante von 9999_L811P bei -120 mV entspricht der Zeitkonstante von 9999 bei 95 bis 90 mV.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Mutation L811P die Deaktivierungskinetik der Kanäle mindestens um die Spannung verschiebt, um welche auch die Aktivierung verschoben ist.

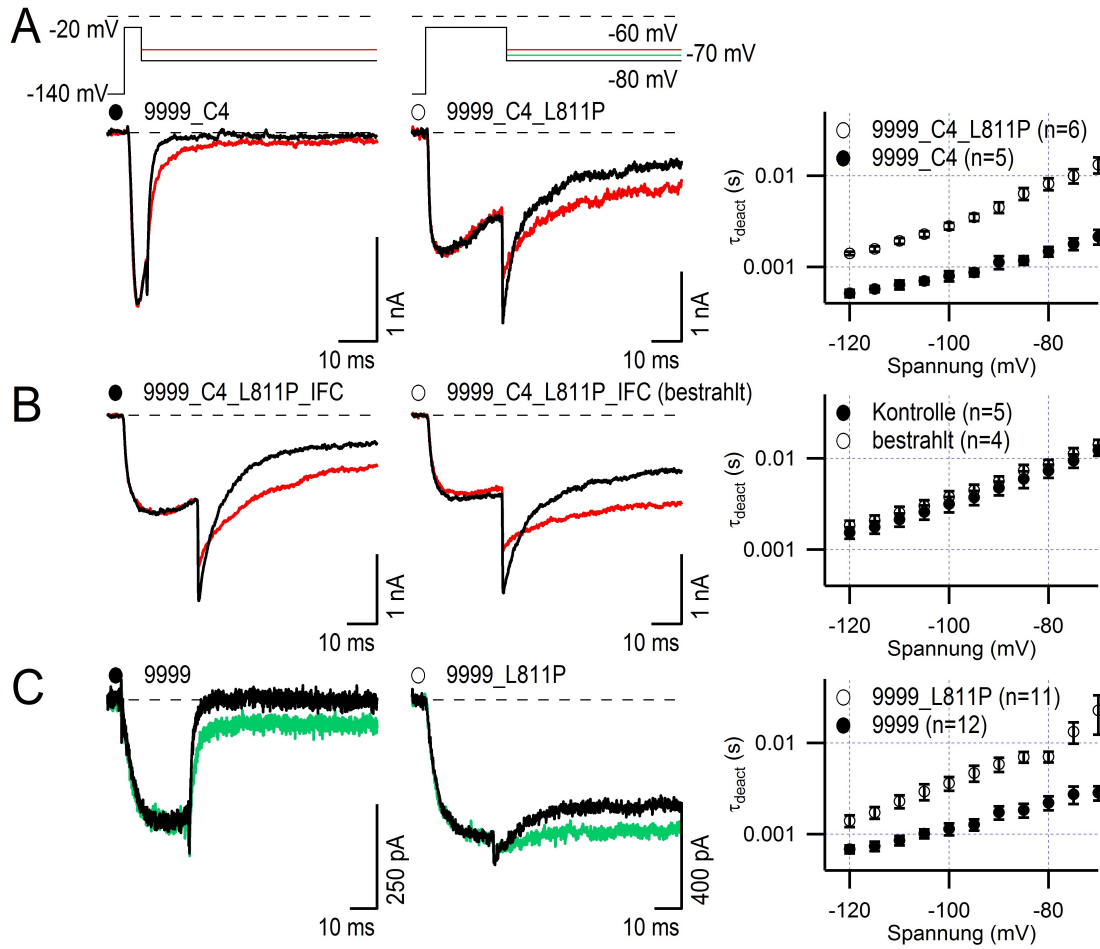


Abbildung 3.38: Die Mutation L811P verändert die Deaktivierung von hNa_V1.9-Kanälen. **A** Stromspuren bei -80 (schwarz) und -60 mV (rot) Deaktivierungsspannung von 9999_C4 und 9999_C4_L811P. Pulsprotokoll ist oben gezeigt. Werte von τ_{deact} über Deaktivierungsspannung aufgetragen. **B** Stromspuren bei -80 (schwarz) und -60 mV (grün) Deaktivierungsspannung von 9999_C4_L811P_IFC vor und nach Bestrahlung mit Blaulicht in Anwesenheit von 200 μ M Lucifer Yellow. **C** Stromspuren bei -80 (schwarz) und -70 mV (grün) Deaktivierungsspannung von 9999 und 9999_L811P analog zu A.

4 Diskussion

4.1 Funktionelle Expression von hNa_v1.9 ist in *Xenopus*-Oozyten nicht möglich

Zu Beginn des Projektes im Jahr 2010 war bereits viel bekannt über die zelluläre Regulation von Na_v1.9-Kanälen, während so gut wie keine pharmakologischen oder toxikologischen Daten publiziert waren. Auch die Ursachen des einzigartigen Schaltverhaltens sind bisher unbekannt. Die heterologe Expression von hNa_v1.9 war zu dem Zeitpunkt nur durch Mikroinjektion von DNA in Maus-DRG-Neuronen möglich [71], was sehr aufwendig ist. Ansonsten bildeten native Na_v1.9-Kanäle von Nagern bisher die Basis für die Untersuchung der Kanaleigenschaften. Neuronen zeichnen sich durch eine Vielzahl exprimierter Kanaltypen aus. So überlagern sich beispielsweise die Na_v1.9- mit Na_v1.8-Strömen in DRG-Neuronen. Eine Messung isolierter Na_v1.9-Ströme ist dort nur in einem kleinen Spannungsfenster möglich. Für eine genaue Untersuchung der Na_v1.9-Funktion ist allerdings eine möglichst reproduzierbare funktionelle Expression und überlagerungsfreie Messung von Kanalmutanten notwendig.

Die vorliegende Arbeit zielte darauf ab, Erkenntnisse über Eigenschaften und die Funktionsweise von hNa_v1.9-Kanälen zu gewinnen. Dazu musste zunächst ein Weg gefunden werden, um hNa_v1.9-Kanäle heterolog exprimieren können. Die verwendeten *Xenopus*-Oozyten stellen ein beliebtes Expressionssystem dar, um Proteine heterolog zu exprimieren [34]. Wenngleich sie eine relativ artifizielle zelluläre Umgebung sind, können Oozyten posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung oder Phosphorylierung durchführen [77] und enthalten sehr wenige endogene Ionenkanäle. Die korrekte Glykosylierung ist insbesondere für die Expression von Membranproteinen wichtig, welche für den Transport über den Golgi-Apparat zur Zellmembran glykosyliert werden müssen [78].

Zur funktionellen Untersuchung von Na_v-Kanälen stellen *Xenopus*-Oozyten ein etabliertes Expressionssystem dar [44]. Allerdings konnte für hNa_v1.9 keine funktionelle Expression festgestellt werden. Es wurde nicht erwartet, dass hNa_v1.9 problemlos heterolog in *Xenopus*-Oozyten exprimiert werden kann. Bisher sind keine entsprechenden Publikationen bekannt, in denen eine erfolgreiche Na_v1.9-Expression in *Xenopus*-Oozyten beschrieben wird.

Die TEVC-Methode ermöglicht es allerdings nicht, Ursachen der fehlenden funktionellen Expression zu untersuchen. Da die zelluläre Regulation von Na_v-Kanälen sehr komplex ist,

gibt es viele mögliche Ursachen. Die Transkription wird im Körper durch komplex aufgebaute Promotorregionen [26,123] reguliert. Für die heterologe Expression spielt das keine Rolle, aber Na_V-Kanäle werden auch durch alternatives Spleißen [75,118,119], Glykosylierung, Phosphorylierung und Dephosphorylierung [128] sowie durch Interaktion mit anderen Proteinen reguliert (Abb. 4.1). Die Wechselwirkungen mit β -Untereinheiten sind am besten untersucht. Sie sorgen für eine stärkere Membranlokalisierung [66] oder verknüpfen die Kanalproteine mit Zytoskelett-Proteinen wie Contactin [105] oder Zelladhäsions-Molekülen wie Neurofascin [132]. Die Untereinheit Na_V β 3 bedeckt ER-Retentionsmotive des Kanals Na_V1.8 und verbessert so die Translokation der Kanäle [64].

Als mögliche ER-Retentionsmotive werden Dupletts oder Tripletts der positiv geladenen Aminosäuren Arginin und Lysin angesehen. Bei hNa_V1.9 kommen im DI-DII-Linker zwei KKRR-Motive getrennt von drei Aminosäuren vor und im DII-DIII-Linker sind drei nicht konservierte Lysindupletts zu finden. Für Na_V1.8 ist u. a. Annexin II an der Translokation des Proteins beteiligt [53].

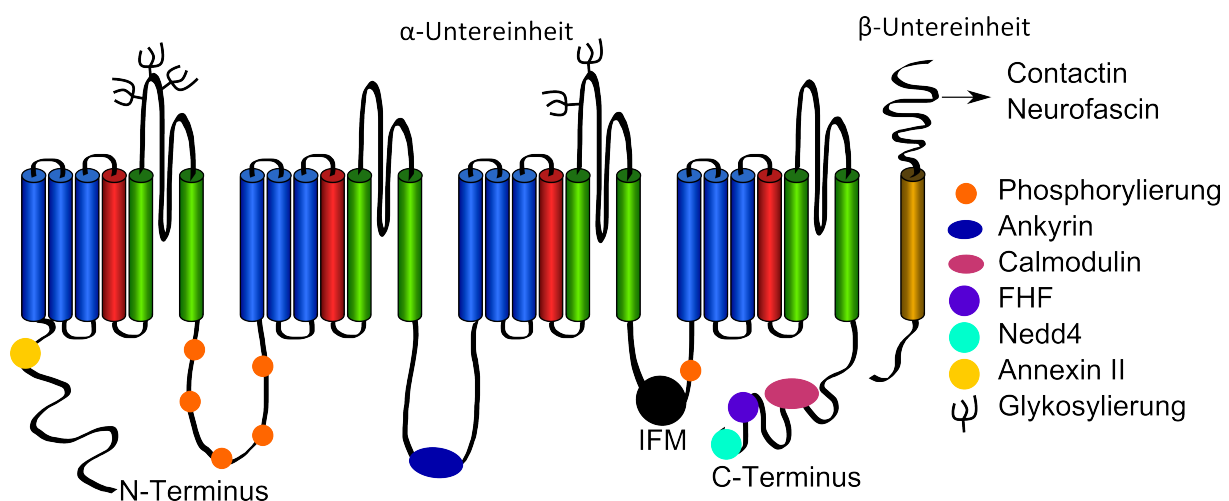


Abbildung 4.1: Die Regulation von Na_V-Kanälen kann durch Proteinmodifikationen oder Proteininteraktionen erfolgen. Über assoziierte β -Untereinheiten interagieren sie mit dem Zytoskelett, aber können auch direkt Interaktionspartner binden. Eine Regulation findet auch durch Phosphorylierungen oder Glykosylierungen statt. Abbildung modifiziert nach Chahine 2005 und Dib-Hajj 2010 [137] [99].

Die Chimäre 9999_C4 zeigte lediglich koexprimiert mit hNa_V β 1 eine signifikant vergrößerte Stromamplitude. Für Na_V1.1 wurde eine Interaktion zwischen C-Terminus und Na_V β 1 festgestellt [122]. Eine Mutation im C-Terminus verhinderte diese Interaktion. Das führte zu Epilepsie bei den betroffenen Patienten. Der verantwortliche Rest Aspartat 1866 ist in allen humanen Na_V-Kanälen konserviert. Es ist aber unklar, ob für die Interaktion noch weitere unkonservierte Reste verantwortlich sind. Außerdem ist unklar, ob hNa_V β 1 auch *in vivo* mit hNa_V1.9 interagiert.

Der L-Typ Calciumkanal Ca_V1.2 konnte durch Koexpression mit Ca_Vβ_{1b} quantitativ zur Zellmembran translozieren, da die Interaktion ER-Retentionssignale im C-Terminus vor der Erkennung durch E3-Ubiquitinligase RFP2 schützte und keine Ubiquitylierung stattfand [39]. Der Unterschied zu Na_V1.9 ist allerdings, dass auch in Abwesenheit von Ca_Vβ_{1b} eine geringe Translokation von Ca_V1.2 zur Membran stattfindet.

Diese Beobachtungen sind relevant, weil bei allen Na_V-Kanälen außer Na_V1.4 und Na_V1.9 PPXY- oder LPXY-Motive im C-Terminus vorhanden sind. An diese können die HECT-Ubiquitin-Ligasen Nedd4 und Nedd4-2 binden und die Kanäle ubiquitylieren [23, 88]. Die Folge ist, dass die Menge an funktionellen Kanälen in der Membran deutlich geringer ist, wenn Nedd4 oder Nedd4-2 mit den Kanälen koexprimiert werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass Na_V1.9 auch Bindemotive für Ubiquitin-Ligasen besitzt, auch wenn bisher keine bekannt sind. Zur weiteren Untersuchung dieses Sachverhaltes wären proteomische Assays notwendig, um etwas über potentielle Ubiquitin-Modifikationen der Na_V1.9-Proteine herauszufinden.

Im Jahr 2013 wurde gezeigt, dass Na_V1.9-Kanäle in ND7/23-Zellen funktionell exprimiert werden können [8]. Die Behandlung der transfizierten Zellen bei 28 °C ist anscheinend angelehnt an die Versuche mit LQT2-Mutanten des hERG-Kaliumkanals, wo sich die ER-Retention durch Inkubation bei 26 °C verringerte [9]. Ein vergleichbarer Effekt konnte durch die Inkubation der Zellen mit Astemizol, einem Antihistaminikum, bei 37 °C erreicht werden [9]. Der Wirkstoff bindet in der inneren Kavität des Kanals und bedeckt möglicherweise ER-Retentionsmotive oder Proteinbereiche, welche aufgrund der Mutation von der zellulären Maschinerie als fehlgefaltet erkannt wurden.

Die ND7/23-Zellen können auch ohne 28 °C-Inkubation eine nachweisbare Zahl von Na_V1.9-Kanälen zur Zellmembran translozieren [8]. Das ist vermutlich möglich, weil die Zelllinie ND7/23 von Ratten-DRG-Neuronen abgeleitet wurde. Es ist bereits bekannt, dass Na_V1.8-Kanäle in dieser Zelllinie sehr viel besser exprimiert werden können als in HEK293-Zellen [24]. Für Kontrollmessungen wurde die funktionelle Expression von hNa_V1.9 in ND7/23-Zellen durch uns analog durchgeführt. Die 28 °C-Inkubation der Zellen ermöglichte jedoch keine funktionelle Expression in anderen Zelllinien wie HEK293T.

4.2 C-Terminus reguliert funktionelle Expression von hNa_V1.9

In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass durch Austausch von Domänen oder Termini erzeugte Na_V-Kanalchimären im rNa_V1.4-Hintergrund funktionell exprimiert werden können: (rNa_V1.2 [120], hNa_V1.5 [114], hNa_V2.1 [30], mNa_V1.7 [31], rNa_V1.8 [115]). Es waren Kanalchimären aus Spannungssensor-Domänen von hNa_V1.9 im K_V2.1-Hintergrund bekannt, welche auf ihre Sensitivität gegenüber Na_V-spezifischen Skorpiontoxinen wie z.

B. ProTx-I untersucht wurden [61].

Die Untersuchung von einzelnen Domänen von hNav1.9 als Kanalchimären im Hintergrund von rNav1.4 war im Prinzip erfolgreich. Bis auf DIII konnten alle untersuchten Kanalfragmente funktionell charakterisiert werden. Die Ursache der fehlenden funktionellen Expression von Chimäre 4494 konnte auf DIII S4-S6 eingegrenzt werden.

Bei keiner der untersuchten Chimären wurden die typischen langsamen Nav1.9-Ströme festgestellt, welche man aus z. B. Maus-DRG-Experimenten kennt. Am humanen Kanalprotein wurde diese typische Kinetik aber bereits nachgewiesen [71]. Möglicherweise fehlt ein Kanalmodulator, welcher sich auf die Kinetik auswirkt. Die Nav1.9-Kinetik könnte auch durch das Zusammenwirken von allen Domänen und Termini von Nav1.9 ausgelöst werden. Daher könnte die schnelle Aktivierung und Inaktivierung die eigentlich dominante Kinetik von Nav-Kanälen sein und die einzigartige Nav1.9-Kinetik aufheben.

Um messbare Stromamplituden von meist nur etwa 100-200 nA zu erhalten, musste bis zu eine Woche nach mRNA-Injektion gewartet werden. Das Expressionsproblem konnte teilweise auf die ungünstigen elektrophysiologischen Eigenschaften der Kanalchimären zurückgeführt werden: in den hyperpolarisierten Spannungsbereich verschobene Inaktivierung und in den depolarisierten Spannungsbereich verschobene Aktivierung z. B. bei Chimäre 4944). Möglich wäre also, dass die Kanalverfügbarkeit beim verwendeten Haltepotential niedrig war und die gemessenen Stromamplituden nur aufgrund der technischen Einschränkungen für das Haltepotential so niedrig ausfielen. Die Na⁺-Ströme bei starken Depolarisationen wurden häufig von auswärts gerichteten endogenen K⁺- oder Cl⁻-Strömen überlagert. Für die Chimäre 4944 konnten außerdem Schaltströme gemessen werden. Die vermeintlich niedrige funktionelle Expression der Chimäre könnte also auch auf geringe Einzelkanalleitwerte zurückgeführt werden. Um diesen Aspekt zu untersuchen wären allerdings Einzelkanalmessungen notwendig.

Die wichtigste Erkenntnis ist, dass der C-Terminus einen großen Einfluss auf die funktionelle Expression von Nav1.9 hat. Das ist auch bereits für den Kanal Nav1.8 bekannt [92]. Ein Austausch der ersten 155 Aminosäuren des C-Terminus von rNav1.8 durch den homologen Teil von rNav1.7 (Abb. 4.2) vergrößert die funktionelle Expression des Kanals deutlich [70]. Dabei ist der Effekt sogar deutlich größer als der Austausch des kompletten C-Terminus. Circular dichroismus-Ergebnisse deuten an, dass die letzten 75 Aminosäuren des C-Terminus bei rNav1.4 weitgehend *random coil*-Strukturen sind [85]. Die 50 Aminosäuren, welche auch das IQ-Motiv bilden, zeigen einen hohen α -Helix-Anteil. Der C-Terminus von allen Nav-Kanälen ist bis zum IQ-Motiv hoch konserviert (Abb. 4.2), es ist also möglich, dass die Unterschiede in der Expression durch das weniger stark konservierte IQ-Motiv auftreten. Der C-Terminus von hNav1.9 ist fast 100 Aminosäuren kürzer als die C-Termini der anderen Nav-Kanäle und endet knapp hinter dem IQ-Motiv (Abb. 4.2), das trifft laut der Circular dichroismus-Daten aus der Literatur weitgehend *random coil*-Strukturen [85].

Die Resultate aus ND7/23-Zellen zeigen eine Vergrößerung der Stromamplitude um mindestens eine Größenordnung durch Austausch des C-Terminus von hNa_V1.9 für Chimäre 9999_C4. Die Stromamplituden von 9999_C4 und 4444_Ys unterscheiden sich nicht so sehr. Transfizierte HEK293T-Zellen zeigten nach 28 °C-Inkubation über Nacht 9999_C4-Ströme, deren Stromamplituden mit Experimenten an ND7/23-Zellen vergleichbar waren. Die funktionelle Expression der Chimäre 4444_C9 erforderte weder in ND7/23- noch HEK293T-Zellen eine Inkubation bei 28 °C, aber die Stromamplituden waren deutlich geringer als für 4444. So konnte im umgekehrten Experiment gezeigt werden, dass der C-Terminus mit der funktionellen Expression der Kanäle im Zusammenhang steht.

In *Xenopus*-Oozyten war der Unterschied der Stromamplituden von 9999_C4 und 4444 deutlich größer, eine Abschätzung ist aber wegen der unterschiedlichen Inkubationszeiten und unterschiedlichen mRNA-Verdünnungen schwierig.

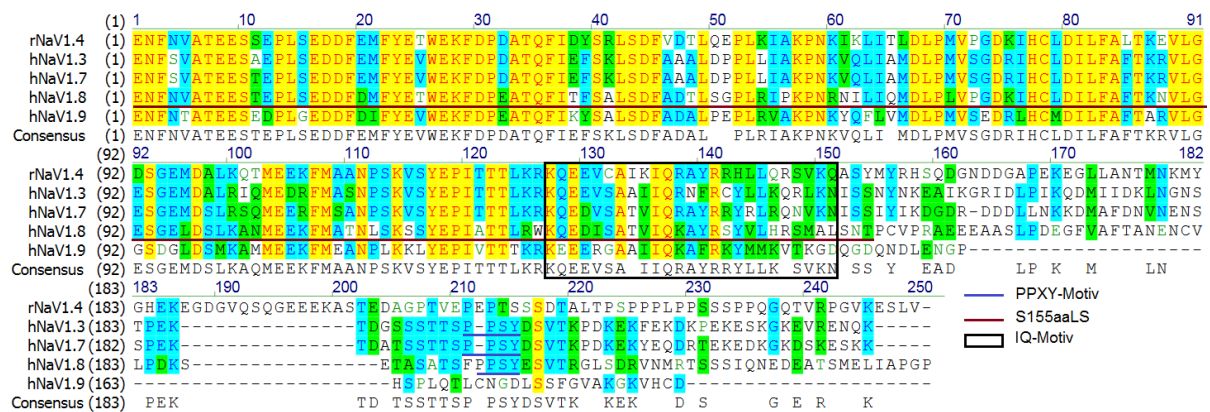


Abbildung 4.2: Die Aminosäuresequenzen der C-Termini ausgewählter Na_V-Kanäle verglichen durch AlignX. Hervorgehoben sind die IQ-Motive im schwarzen Kasten, das PPXY-Motiv (blau unterstrichen) und die Länge des Na_V1.7-Anteils der C-Terminuschimäre (rot) aus [70].

4.3 C-Terminus reguliert

Gleichgewichts-Inaktivierung von hNa_V1.9

Die Inaktivierung im Gleichgewicht ist eine wichtige Eigenschaft von Na_V-Kanälen, anhand der sich ableiten lässt, welcher Anteil der Kanäle bei verschiedenen Membranpotentialen aktiviert werden kann. Es ist bekannt, dass insbesondere der C-Terminus von Na_V-Kanälen die Kanalinaktivierung im Gleichgewicht reguliert [6, 7].

Mit den TEVC-Messungen der Chimären 4449 und 4444_C9 wurde eine Verschiebung von Aktivierung und Inaktivierung jeweils in den depolarisierten Spannungsbereich im Vergleich zu 4444 festgestellt. Von dieser Verschiebung war die Inaktivierung stärker als die Aktivierung betroffen. Bei 4449_C4 wurde jedoch fast keine Verschiebung im Vergleich

zu 4444 gemessen. So zeigte sich, wie der Austausch des C-Terminus alleine ausreicht, um die Eigenschaften einer Na_V-Isoform auf eine andere zu übertragen, während DIV von Na_V1.9 keinen Einfluss auf die Gleichgewichtsinaktivierung hat. Der Effekt bei Chimäre 4449 ist größer als bei 4444_C9, wenngleich die Ursache dafür nicht aufgeklärt werden konnte. Vermutlich ist die Funktion von DIV und C-Terminus in den Kanälen aufeinander abgestimmt und beide Domänen bilden zusammen eine funktionelle Einheit.

Die TEVC-Ergebnisse von 9999_C4 deuteten auch auf eine Verschiebung der Gleichgewichtsinaktivierung hin. Allerdings konnte erst mithilfe der Patch-Clamp-Messungen diese Beobachtung auch für hNa_V1.9 bestätigt werden. So führte der Austausch des C-Terminus zur analogen Verschiebung von Aktivierung und Gleichgewichtsinaktivierung zu hyperpolarisierten Spannungen im Vergleich zu rNa_V1.4. Die Auswirkungen des C-Terminus auf die Gleichgewichtsinaktivierung müssen durch Interaktion mit dem DIII-DIV-Linker stattfinden. Für Na_V1.5 wurde ein Mechanismus unter Mitwirkung eines vom IQ-Motiv gebundenen Ca²⁺/CaM postuliert [15]. Auch wenn wir mit den elektrophysiologischen Messungen keine direkte Interaktion von Proteinen messen können, ist eine Interaktion von C-Terminus und Inaktivierungslinker vermutlich notwendig, um solch große Auswirkungen zu erreichen.

4.4 Chimäre 9999_C4 als Hilfsmittel zur Untersuchung der hNa_V1.9-Funktion

Die Kanalchimären lassen sich als Hilfsmittel für die Untersuchung von Toxineffekten in *Xenopus*-Oozyten oder Säugerzellen wie HEK293T-Zellen einsetzen. Der größte Vorteil ist, dass die Kanäle isoliert von anderen Na_V-Kanälen untersucht werden können und dass in Abwesenheit von TTX, TEA oder Cadmium gearbeitet werden kann. Das ist insbesondere von Bedeutung, wenn TTX-sensitive Mutanten exprimiert werden sollen. Sollten Toxine entdeckt werden, die auf Na_V1.9-Kanäle wirken, können die Chimären bei der Aufklärung des Wirkmechanismus helfen.

Für Experimente mit Zellen, welche hNa_V1.9 nicht funktionell exprimieren können, ist die Chimäre 9999_C4 eine sinnvolle Alternative. Mit Ausnahme des C-Terminus ist die vollständige hNa_V1.9-Sequenz erhalten geblieben. Somit besitzt dieses Konstrukt viele Eigenschaften von hNa_V1.9. In TEVC-Experimenten konnte das aufgrund der fehlenden Wildtypkontrolle nicht gezeigt werden, aber mithilfe der Patch-Clamp-Messungen wurde u. a. die Aktivierung bei hyperpolarisierten Spannungen bestätigt. Auch die Kanalmutanten L811P, IFC oder IQM zeigten die erwarteten Eigenschaften. Daher könnten Toxinexperimente mit 9999_C4 durchgeführt werden.

Die besondere F⁻-Sensitivität von hNa_V1.9 ist bereits beschrieben worden [68, 79], allerdings ist der Mechanismus bisher unverstanden. Die Toxizität von F⁻ äußert sich u.

a. durch Hemmung von Phosphatasen [72]. Gezeigt wurde, dass Na_V1.9-Kanäle durch PKC-Stimulation eine Verschiebung der halbmaximalen Aktivierungsspannung erfahren und so in ihrer Aktivität verändert werden [76]. Überraschend ist, dass dieser Effekt nicht beobachtet werden kann, wenn eine F⁻-haltige Internlösung verwendet wird [76]. Es gibt vier Möglichkeiten, wie das erklärt werden könnte: F⁻ und Phosphat können an den gleichen Stellen binden und sorgen für den gleichen Effekt. F⁻ und Phosphat binden an unterschiedlichen Stellen im Protein, allerdings bewirkt die Kombination beider Auslöser keinen synergistischen Effekt. F⁻ könnte auch PKC-Proteine vergiften und deshalb wird kein PKC-Effekt auf Na_V1.9-Kanäle detektiert. In Anwesenheit von F⁻ sinkt die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration auf 0, da CaF₂ unlöslich ist. Der F⁻-Effekt könnte also auch auf eine Ca²⁺-Depletion zurückgehen.

Die F⁻-Experimente konnten diese Frage nicht beantworten. Die Ursache für die unterschiedlichen Spannungsabhängigkeiten zwischen den TEVC- und den Patch-Clamp-Messungen in ND7/23-Zellen ließen sich jedoch auf die Anwesenheit von F⁻ zurückführen. Somit können die Daten aus *Xenopus*-Oozyten bestätigt werden. Der Effekt von 30 mM F⁻ von 9999_C4 war dabei vergleichbar mit Ergebnissen aus der Literatur [79]. Es konnte also gezeigt werden, dass der Austausch des Terminus keinen Einfluss auf die F⁻-sensitivität von hNa_V1.9 hatte. Bei der Verwendung von 105 mM F⁻ war der Effekt fast doppelt so groß. Das F⁻ scheint einen verstärkenden Effekt auf 9999_C4 zu besitzen, da die Kanalaktivierung deutlich stärker beeinflusst wurde als die Inaktivierung. Eine Ursache dafür war auch die Vergrößerung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung in Anwesenheit von F⁻, während die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung unverändert blieb. Mechanistisch bedeutet das in Abwesenheit von F⁻ ein Erreichen der maximalen Stromantwort bei stärkeren Depolarisationen. Die Amplitude fällt außerdem aufgrund der niedrigeren Kanalverfügbarkeit geringer aus. Allerdings führten diese intrazellulären Bedingungen auch bei rNa_V1.4 zu einer Verschiebung der halbmaximalen Aktivierungsspannung, während bei 30 mM F⁻ keine Veränderung festgestellt werden konnte.

Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur Na_V1.9-Kanäle F⁻-sensitiv sind, allerdings ist die Sensitivität bei Na_V1.9 größer. Das warf die Frage auf, ob alle Na_V-Kanäle F⁻-sensitiv sind. Der F⁻-Effekt ist im Fall von rNa_V1.4 nicht auf eine Ca²⁺-Depletion zurückführbar. Um die Wirkung von F⁻ auf Na_V1.9-Kanäle besser zu verstehen sind weitere Experimente notwendig. Denkbar wäre es, die *Cut-Open*-Patch-Clamp-Methode an *Xenopus*-Oozyten einzusetzen und die Kanalchimären unter verschiedenen F⁻-Konzentrationen oder in Anwesenheit von Vanadat zu untersuchen, welches zur ubiquitären Inhibition von Phosphatasen eingesetzt wird.

4.5 Serin 360 vermittelt TTX- und STX-Resistenz von hNa_V1.9

Die Untersuchung der TTX- und STX-Sensitivität von Na_V-Strömen in DRG-Neuronen wurde begonnen, als die TTX-resistenten Kanäle Na_V1.8 und Na_V1.9 noch nicht bekannt waren [125]. Damals wurde gezeigt, dass die TTX-sensitive Kanalfraktion auch STX-sensitiv ist bzw. dass die TTX-resistente Kanalfraktion STX-resistent ist. Für Na_V1.8 wurde bereits gezeigt, dass das Serin 356 die TTX-Resistenz des Kanals vermittelt [54]. Der Austausch von Serin durch Phenylalanin resultierte in einer IC₅₀ für TTX von etwa 3 nM und für STX von 8 nM [54]. Der IC₅₀-Wert für TTX ist deutlich niedriger als es für rNa_V1.2 beobachtet wurde [90], wohingegen der IC₅₀-Wert für STX deutlich höher ist als für rNa_V1.2 mit 1.2 nM [90].

Wir haben das Serin 360 durch ein Tyrosin ersetzt, um die Rezeptorstelle von 4444 nachzuahmen. Damit ist die Affinität der Rezeptorstelle mit einem Tyrosin für TTX im Vergleich zum Phenylalanin bereits herabgesetzt. Es zeigte sich, dass 9999_C4_IQM_S360Y mit einer IC₅₀ von etwa 6 nM deutlich TTX-sensitiver ist als 4444_IQM mit 17 nM. Der Unterschied zwischen 4444_IQM mit einer IC₅₀ von 2.5 nM und 9999_C4_IQM_S360Y bei 4 nM ist eher zu vernachlässigen.

Alle Kanalgene gehen vermutlich auf einen gemeinsamen Vorfahren zurück [42]. Die Fähigkeit zur TTX- und STX-Bindung in der äußeren Pore ist eine immanente Na_V-Kanaleigenschaft und die Sensitivität wird hauptsächlich durch den bereits erwähnten Rest Phenylalanin, Tyrosin, Cystein oder Serin im DI S5-S6-Linker definiert. Die Resultate für die Na_V1.9 erbrachten somit für das Verständnis der TTX- und STX-Bindung keine neuen Erkenntnisse.

Die μ SIHA-Experimente konnten zeigen, dass Na_V1.9 erwartungsgemäß resistent für das μ Conotoxin ist. Für die Toxinexperimente mit *Xenopus*-Oozyten wurden pro Messung 25 μ l einer 20 μ M Toxinlösung verbraucht. Die meisten Toxine waren nicht in der Menge für TEVC-Experimente vorhanden. Sinnvoller wäre es, die Experimente mit Säugerzellen durchzuführen, da die Oozyten häufig nicht stabil waren und der Toxinverbrauch bei Patch-Clamp-Messungen deutlich geringer ist.

4.6 Die Kanalinaktivierung von hNa_V1.9 ist IFM-vermittelt

Die schnelle Inaktivierung von Na_V-Kanälen ist eine essentielle Kanaleigenschaft, welche an die Kanalaktivierung gekoppelt ist [127]. Ihre Kinetik unterscheidet sich zwischen den einzelnen Isoformen sehr deutlich [127]. Die Bindung des IFM-Motivs in der Pore wird durch komplexe Interaktionen mit vielen Bereichen wie der inneren Kavität oder dem

DIV S4-S5-Linker [127] vermittelt und der Stromfluss inhibiert. Darüberhinaus beeinflussen auch die Bewegung von DIV S4 und der C-Terminus diesen Prozess [127]. Bisher war unklar, ob die einzigartig langsame Inaktivierungskinetik von $Na_V1.9$ durch IFM-vermittelten Porenverschluss abläuft.

Die schnelle Inaktivierung kann durch verschiedene Herangehensweisen modifiziert werden. Glutaminaustausche im IFM-Motiv verringern die Hydrophobizität des α -Helixabschnittes und bewirken Inaktivierungsdefizienz [133]. Der Austausch durch Cysteine oder Methionine bewirkt eine oxidationssensitive, schnelle Inaktivierung [84, 116]. Zusätzlich haben auch weitere intrazelluläre Methionine verteilt über den ganzen Kanal im Bereich des vermuteten Akzeptors des Inaktivierungsmotivs bei Oxidation deutliche Auswirkungen auf die schnelle Inaktivierung [110]. Außerdem führen Ladungsentfernungen in DIV S4 [113] oder die Mutationen L435W/L437C/A438W (WCW) in DI S6 [13] zu einer Beeinflussung der schnellen Inaktivierung.

Mithilfe der Kanalschimären mit IFC-Mutation konnte einerseits gezeigt werden, dass die Methode reproduzierbar für verschiedene Na_V -Kanäle angewendet und andererseits hervorragend als Kontrolle verwendet werden kann, um kleine Stromamplituden in *Xenopus*-Oozyten vom Endogenstrom zu unterscheiden. Das Cystein ist dabei so sensitiv, dass relativ milde Thiol-spezifische Modifikatoren wie das membranpermeable DTNP eingesetzt werden können. Während bei Patch-Clamp-Experimenten durch Lucifer Yellow erzeugte intrazelluläre reaktive Spezies die Inaktivierung von 9999_C4_IFC vergleichbar effektiv entfernen konnten, blieb 9999_IFC unbeeinflusst. Auch die Verwendung des voluminöseren, geladenen Cysteinmodifikators MTSET konnte die Inaktivierung von 9999_IFC nicht beeinflussen.

Das könnte die Ursache sein, warum durch Cysteinmodifikation keine $Na_V1.9$ -Ströme in *Xenopus*-Oozyten stimuliert werden konnten. Aus unbekannten Gründen ist 9999_IFC resistent gegen Cysteinmodifikation mit Lucifer Yellow oder MTSET. Die IQM-Mutanten waren eigentlich nur dazu konzipiert, um in Abwesenheit potentiell redox-aktiver Agenzien Untersuchungen von Toxinen an *Xenopus*-Oozyten durchzuführen. Es war bekannt, dass die funktionelle Expression inaktivierungsdefizienter Kanäle in Säugerzellen sehr niedrig ist [133]. In *Xenopus*-Oozyten sorgte die Mutation jedoch für einen vergleichbaren Effekt auf die schnelle Inaktivierung, wie es bereits durch die IFC-Mutanten oder aus der Literatur bekannt war [133]. Mithilfe der Mutante 9999_IQM konnte gezeigt werden, dass $hNa_V1.9$ prinzipiell eine IFM-vermittelte Inaktivierung besitzt.

Die Inaktivierungslinker-Helix könnte durch Interaktion mit dem $hNa_V1.9$ -C-Terminus verdreht sein, wodurch das modifizierte Cystein für die Bindung am Akzeptor nicht mehr relevant ist. Vorstellbar wäre auch eine Abschirmung des Cysteins durch den C-Terminus. Wie bereits gezeigt wurde, sind die IFM-Motive verschiedener Na_V -Kanäle unterschiedlich redox-empfindlich [110]. Ein Großteil von LQT3-Mutationen in $Na_V1.5$ stehen im Zusammenhang mit gestörter Kanalinaktivierung [83]. An den Mutationen L811P und L1158P

lassen sich die Folgen einer verlangsamten Inaktivierungskinetik von hNa_V1.9 zeigen. Mit Hilfe von 9999_IQM ließen sich Stromantworten mit über 5 s Offenzeit stimulieren. Zum Schutz der Neuronen vor Depolarisation und Stabilisierung des Ruhemembranpotentials ist es daher wichtig, die Inaktivierung von hNa_V1.9 vor oxidativer Verlangsamung zu schützen. Die Unempfindlichkeit von Na_V1.9 könnte also eine evolutionäre Anpassung darstellen.

Um diesen Sachverhalt weiter zu untersuchen, müssen hNa_V1.9-Kanäle in mDRG-Neuronen exprimiert werden und auf ihre Sensitivität gegenüber dem eher Methioninspezifischen Chloramin-T untersucht werden. Alternativ könnten die Punktmutanten von hNa_V1.9 9999_ICM oder 9999_IFMC auf ihre Redox-Sensitivität untersucht werden.

4.7 Analgesie ausgelöst durch überaktive hNa_V1.9-Kanäle

Die Mutation L811P ist die erste *De-Novo*-Mutation, welche für Na_V1.9 im Zusammenhang mit einem komplexen Krankheitsbild steht [45]. Es umfasst congenitale Analgesie, Muskelschwäche, Hyperhidrose und Störungen der Darmmotilität. Die betroffenen Gewebe waren histologisch betrachtet weitgehend unverändert [45].

Anhand eines Mausmodells verdeutlichte sich, dass die Mutation einen *gain-of-function* der Kanalproteine bewirkt [45]. Einige Mäuse zeigten mit den Patienten vergleichbare selbst zugefügte Verletzungen [45]. In Stromklemme-Messungen war das Ruhemembranpotential der DRG-Neuronen deutlich in depolarisierte Richtung verschoben, während es bei Scn11a^{-/-}-Mäusen in hyperpolarisierte Spannungsrichtung verschoben war [45]. Die Resultate von EPSC-Messungen deuten auf eine herabgesetzte neuronale Aktivität hin [45]. Im Tiermodell gewonnene Erkenntnisse zeigten eine deutlich herabgesetzte Schmerzempfindung, aber keine vollständige Analgesie, wie es bei den Patienten der Fall ist [45].

Die Veränderungen der Chimäre 9999_C4_L811P äußerten sich nicht nur durch eine frühere Kanalaktivierung und eine verlangsamte Kanalinaktivierung in *Xenopus*-Oozyten. Auch das stark verschobene Umkehrpotential in Oozyten war vermutlich auf eine basale Menge dauerhaft offener Kanäle und damit permanenten Na⁺-Einstrom zurückführbar. Hinsichtlich ihrer Pharmakologie für das Toxin TTX war die äußere Pore von 9999_C4_L811P in *Xenopus*-Oozyten nicht verändert. Die in ND7/23-Zellen gemessenen Konstrukte zeigten mit TEVC-Messungen vergleichbare Resultate.

Die Untersuchung der Mutation in ND7/23-Zellen im Wildtyp Hintergrund war zum Vergleich von hNa_V1.9_L811P mit mNa_V1.9_L799P erforderlich. Die Kanalaktivierung und Deaktivierung von hNa_V1.9_L811P und mNa_V1.9_L799P sind vergleichbar, allerdings unterscheidet sich die Gleichgewichts-Inaktivierung sehr deutlich. Während diese sowohl bei mNa_V1.9_L799P als auch bei 9999_C4_L811P um fast 30 mV in den hyperpolari-

sierten Spannungsbereich verschoben ist, ist bei hNa_V1.9_L811P lediglich die Spannungsabhängigkeit deutlich größer im Vergleich zum Wildtyp. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass bei einem Ruhemembranpotential von ca. -60 mV ein viel größerer Anteil von hNa_V1.9_L811P-Kanälen noch aktivierbar ist, während mNa_V1.9_L799P-Kanäle bereits in den inaktivierten Zustand übergegangen sind.

Die Aminosäure Leucin 811 befindet sich am distalen Ende von DII S6 (Abb. 4.3A) und ist in Säugetieren hoch konserviert (Abb. 4.3B). Die Mutation zu Prolin bewirkt einerseits vermutlich eine verkürzte α -Helix. Andererseits sind die Enden der S6-Segmente in die Bildung der Akzeptorstelle für das Inaktivierungsmotiv involviert [5]. Die sich im distalen Bereich des DI S6-Segmentes befindlichen WCW-Mutationen bewirken Inaktivierungsdefizienz von rNa_V1.4 [13]. Es ist auch eine hNa_V1.9-Mutation L1158P am distalen Ende DIII S4-Segmentes funktionell untersucht [104]. Diese Mutation bewirkt eine verlangsamte Kanalinaktivierung und Deaktivierung, allerdings ist die Kanalaktivierung unverändert und die Gleichgewichtsinaktivierung ist in den hyperpolarisierten Spannungsbereich verschoben.

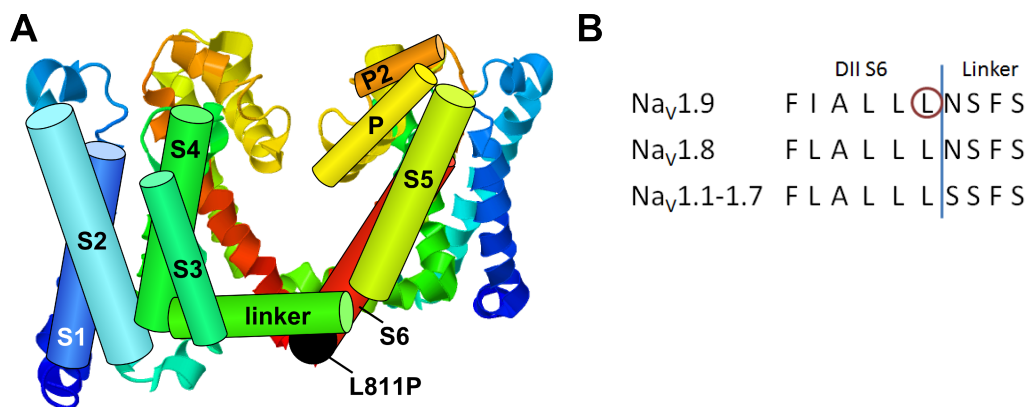


Abbildung 4.3: Die Mutation L811P befindet sich am distalen Ende von DII S6. **A** Kristallstruktur von Na_VAb der zwei gegenüber liegenden Domänen DII und DIV. Die Helixverläufe wurden zur besseren Übersicht für DII eingezeichnet. Leucin 811 ist durch schwarzen Kreis hervorgehoben. **B** Das Leucin 811 ist in den Na_V-Kanälen von Säugetieren hoch konserviert.

Die Mutation L1158P bewirkt in einem Patienten eine schmerzhafte Neuropathie und damit einen vollkommen anderen Phänotyp [104]. Es wurde auch von einer R225C-Mutation in DI S4 von hNa_V1.9 im Zusammenhang mit familiärem episodisch chronischem Schmerz berichtet [56]. Es sind keine Daten von Spannungsklemme-Messungen dazu veröffentlicht worden, aber die Stromklemme-Daten zeigen wie bei der L1158P-Mutation eine erhöhte Kanalaktivität. Damit verdeutlicht sich, dass eine erhöhte hNa_V1.9-Aktivität Dysfunktionen der Nozizeption mit z. T. unerträglichen Schmerzen auslösen kann, wie es bereits für hNa_V1.7 bekannt ist [100]. Andererseits kann eine extrem erhöhte hNa_V1.9-Aktivität das Schmerzempfinden blockieren. Bei hNa_V1.7 löst lediglich der Verlust der

Kanalfunktion Analgesie aus (Abb. 4.4A). Die gegensätzliche Beobachtung für $hNa_V1.9$ stellt einen Paradigmenwechsel dar (Abb. 4.4B). Die Mutation L811P trat in den Patienten heterozygot auf. Untersuchte homozygote L799P-Mäuse zeigten in Schmerz- und Stromklemme-Experimenten einen deutlich milderen Phänotyp [46], wenngleich auch diese Tiere unter selbst zugefügten Verletzungen wie die Patienten litten.

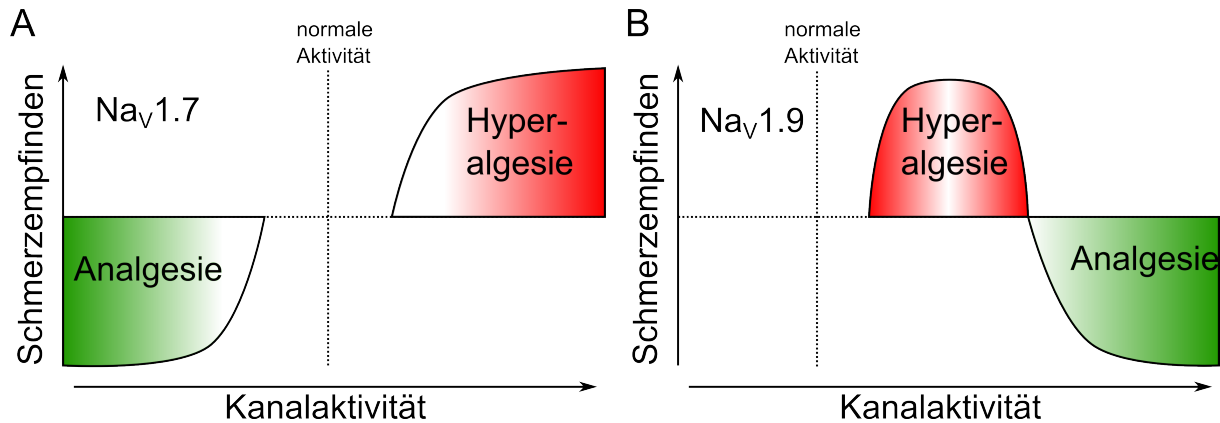


Abbildung 4.4: Aktivität von $Na_V1.7$ und $Na_V1.9$ mit deren Auswirkungen auf das Schmerzempfinden. **A** Während ein Verlust der $Na_V1.7$ -Aktivität zu einer verringerten Schmerzempfindung führt, bewirkt ein *gain-of-function* ein erhöhtes Schmerzempfinden. **B** Möglicher Zusammenhang von $Na_V1.9$ -Aktivität und Schmerzempfinden basierend auf bisherigen Erkenntnissen. Bisher ist unklar, wie sich eine Dysfunktion von $Na_V1.9$ im Menschen äußert. Eine geringfügige Erhöhung der Kanalaktivität bewirkt jedoch Hyperalgesie und eine starke Erhöhung der Kanalaktivität löst Analgesie aus.

Die Patch-Clamp-Messungen fanden bei Raumtemperatur statt. Messungen bei physiologischen Temperaturen könnten die Frage nach den kinetischen Eigenschaften von $hNa_V1.9$ *in vivo* klären. Das ist notwendig, da bisher ungeklärt ist, wie sich dieser Kanal bei Körpertemperatur oder in der Kälte verhält. Über $Na_V1.8$ ist bekannt, dass der Kanal für die Weiterleitung von Schmerzsignalen bei Kälte verantwortlich ist [81].

Insgesamt scheint die Funktion von $Na_V1.9$ in der Regulation des Ruhemembranpotentials in verschiedenen Geweben zu bestehen. Anhand des komplexen Krankheitsbildes lässt sich bestätigen, dass $Na_V1.9$ -Kanäle Einfluss auf viele Körperfunktionen haben. Es ist wahrscheinlich, dass eine spezifische Inhibierung des $hNa_V1.9$ -Kanals die Schmerzempfindung der Patienten mit L811P-Mutation wiederherstellen oder die Hyperalgesien bei anderen Patienten mit $Na_V1.9$ -Mutationen verhindern könnten.

Im Moment sind keine spezifischen Blocker für $Na_V1.9$ -Kanäle bekannt. Es wurde aber ein monoklonaler Antikörper gegen $Na_V1.7$ als mögliches Schmerzmittel entwickelt [124]. Es ist auch der spezifische $Na_V1.8$ -Inhibitor A-803467 verfügbar [27]. Nach diesem Prinzip hergestellte spezifische $Na_V1.9$ -Blocker könnten als Schmerzmittel eingesetzt werden.

5 Zusammenfassung & Summary

5.1 Zusammenfassung

Spannungsgesteuerte Natriumkanäle (Na_V -Kanäle) sind große Membranproteine von ca. 260 kDa. Sie bilden 24 Transmembranhelices, welche in vier Domänen um die Pore angeordnet sind. Im Ruhezustand sind die Kanäle geschlossen. Sie reagieren auf Membrandepolarisation mit der Öffnung der Pore und leiten dann hochselektiv Na^+ -Ionen.

Die Aufgabe von acht der neun humanen kanonischen Kanalisofomen ($\text{Na}_V1.1$ - $\text{Na}_V1.8$) besteht darin, Aktionspotentiale zu initiieren. Diese Na_V -Kanäle weisen eine schnelle Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik auf. Aber der weniger homologe $\text{Na}_V1.9$ -Kanal unterscheidet sich von den anderen Vertretern durch eine sehr langsame Kinetik mit einer hohen Aktivität bei negativeren Membranspannungen. Dieser Kanal kann aufgrund der besonderen Eigenschaften keine Aktionspotentiale auslösen. Vermutlich besteht die physiologische Rolle von $\text{Na}_V1.9$ in der Regulation des Ruhemembranpotentials, was bisher aber nicht bewiesen werden konnte. Der $\text{Na}_V1.9$ -Kanal ist stark exprimiert in nozizeptiven Sensorneuronen im dorsalen Horn des Rückenmarks und wird als schmerzrelevant bezeichnet. Allerdings hat ein *knock-out* nur sehr geringe Auswirkungen auf das Schmerzempfinden in Mäusen.

Die vorliegende Arbeit zielte darauf ab, heterolog exprimierte h $\text{Na}_V1.9$ -Kanäle funktionell zu charakterisieren. Für die Untersuchung von isolierten h $\text{Na}_V1.9$ -Kanälen wurden Zweielektroden-Spannungsklemme- bzw. Patch-Clamp-Messungen in verschiedenen Expressionssystemen durchgeführt. Es wurden neuronale Säugerzelllinien (ND7/23-Zellen) und andere tierische Zellen (*Xenopus*-Oozyten oder HEK293T-Zellen) eingesetzt. Ströme von h $\text{Na}_V1.9$ konnten in ND7/23-Zellen detektiert werden, aber in *Xenopus*-Oozyten und HEK293T-Zellen wurden keine funktionellen Kanäle festgestellt.

Um das Problem der funktionellen Expression zu überwinden, wurden Kanalchimären mit Domänen von h $\text{Na}_V1.9$ im Hintergrund des besser exprimierenden r $\text{Na}_V1.4$ hergestellt und ebenfalls elektrophysiologisch untersucht. Der Austausch des C-Terminus von h $\text{Na}_V1.9$ durch den von r $\text{Na}_V1.4$ resultierte in einer Kanalchimäre mit vollständiger h $\text{Na}_V1.9$ -Pore, welche auch in nichtneuronalen Zellen funktionell exprimiert werden konnte. Dieses Konstrukt wurde zur Untersuchung der Sensitivität von h $\text{Na}_V1.9$ für typische Neurotoxine wie Tetrodotoxin (TTX) und Saxitoxin (STX) eingesetzt. Der Kanal h $\text{Na}_V1.9$ ist resistent gegen TTX und STX. Als Ursache dafür wurde Serin 360 in der

Porenschleife von Domäne 1 identifiziert. Der Austausch durch Tyrosin resultiert in einer vergleichbaren TTX- sowie STX-Sensitivität wie bei anderen Na_V-Kanälen.

Es konnte keine Domäne als Auslöser für die einzigartige Kinetik von hNa_V1.9 identifiziert werden, denn alle Kanalchimären zeigten eine mit rNa_V1.4 vergleichbare, typische Na_V-Kanalkinetik. Allerdings bewirkt der C-Terminus von hNa_V1.9 die stark depolarisierte Gleichgewichts-Inaktivierung.

Die schnelle Inaktivierung von Na_V-Kanälen wird durch den intrazellulären Verschluss der Pore mit dem Inaktivierungspartikel Isoleucin, Phenylalanin sowie Methionin (IFM-Motiv) im Linker zwischen Domäne 3 und 4 vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass die deutlich langsamere Inaktivierungskinetik von hNa_V1.9 auch durch das IFM-Motiv ausgelöst wird.

Die heterologe Expression von hNa_V1.9 ermöglichte die funktionelle Charakterisierung der ersten Channelopathie von Na_V1.9 ausgelöst durch die Mutation L811P. Diese *De-Novo*-Mutation wurde in zwei Patienten mit einem komplexen Krankheitsbild festgestellt, welches u. a. in einer congenitalen Analgesie resultiert. Es wurde in *Xenopus*-Oozyten und in ND7/23-Zellen eine substantiell gesteigerte Aktivität der Kanäle durch die Mutation L811P festgestellt. Einerseits waren die mutierten Kanäle bei deutlich negativeren Spannungen als der Wildtyp aktiv und andererseits war die Inaktivierung der Kanäle stark verlangsamt. Die funktionelle Untersuchung von hNa_V1.9 war essentiell, um die Resultate des Mausmodells auf den Menschen übertragen zu können.

Der Kanal Na_V1.9 reguliert das Ruhemembranpotential in nozizeptiven Sensorneuronen. Zusätzlich deuten die anderen gestörten Körperfunktionen der Patienten mit L811P-Mutation (Darmmotilität, Motorik sowie Schwitzen) auf eine abundante physiologische Rolle von Na_V1.9-Kanal in vielen Geweben und bei vielen physiologischen Prozessen im Menschen hin.

5.2 Summary

Voltage-gated Na⁺ channels are large membrane proteins of about 260 kDa. They form 24 transmembrane helices which assemble in four domains incorporating the pore. In resting state the channels are closed. Na⁺ channels activate in response to membrane depolarisation and are highly selective for Na⁺ ions.

Eight in nine canonical Na⁺ channel isoforms (Na_V1.1-Na_V1.8) initiate action potentials in humans. Their channel gating is very fast. On the contrary the less conserved Na_V1.9 has an exceptionally slow channel gating and the activity of Na_V1.9 cannot generate action potentials. Probably the physiological role of Na_V1.9 is to regulate the resting membrane potential. This has not been proven, yet. Na_V1.9 channels are related to pain perception and strongly expressed in the dorsal roots of the spinal cord. However the *knock-out* of

Na_V1.9 hardly interferes with the pain sensation in mice.

This study was aimed at the characterization of hNa_V1.9 channels expressed in heterologous expression systems. To examine isolated hNa_V1.9 channels we performed two-electrode voltage-clamp or patch-clamp experiments in neuronal mammalian cell lines (ND7/23 cells) or other cells (HEK293T or *Xenopus* oocytes). Functional hNa_V1.9 channels were exclusively detected in ND7/23 cells.

Domains of hNa_V1.9 were expressed as channel chimeras in rNa_V1.4 background to overcome the lack of functional expression. We substituted the c-terminus of hNa_V1.9 for the c-terminus of rNa_V1.4 resulting in a construct with complete hNa_V1.9 pore that can be expressed in non-neuronal cells. This chimera was used to examine the sensitivity of hNa_V1.9 for the typical neurotoxins tetrodotoxin (TTX) and saxitoxin (STX). The hNa_V1.9 channels are resistant for both TTX as well as STX. The resistance of hNa_V1.9 is due to serine 360 in the pore loop of domain 1. A sensitivity for TTX and STX comparable with other Na⁺ channels was achieved by mutating the serine to tyrosine.

The fast inactivation of Na⁺ channels is triggered by the inactivation particle isoleucine, phenylalanine and methionine (IFM motif) which occludes the pore. We were able to show that the slower inactivation kinetics of hNa_V1.9 is still mediated by the IFM motif.

The heterologous expression hNa_V1.9 facilitated the functional analysis of the first hNa_V1.9 channelopathy due to L811P mutation. This *de novo* mutation was detected in two patients with a complex disease pattern including congenital analgesia. We found evidence in *Xenopus* oocytes and ND7/23 cells that the L811P mutation causes a substantially higher channel activity. In particular these channels open at more negative potentials and the channel inactivation is vastly decelerated. The examination of hNa_V1.9 channels was necessary to transfer the results of the animal model to human.

hNa_V1.9 channels regulate the resting membrane potential in nociceptive sensory neurons. Additionally the further dysfunctions in L811P patients imply functions of hNa_V1.9 in other tissues beyond nociception.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Blum R & Kafitz KW & Konnerth A. Neurotrophin-evoked depolarization requires the sodium channel $\text{Na}_V1.9$. *Nature*, 419(6908):687–693, 2002.
- [2] Hodgkin AL & Huxley AF. Propagation of electrical signals along giant nerve fibers. *Proceedings of the Royal Society of London*, 140(899):177–183, 1952.
- [3] Kandel ER & Schwartz JH & Jessell TM & Siegelbaum SA & Hudspeth AJ. *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill, New York, 2013.
- [4] Agnew WF & Alvarez RB & Yuen TG & Crews AK. Identification of a large molecular weight peptide associated with a tetrodotoxin binding protein from the electroplax of *Electrophorus electricus*. *Cell and Tissue Research*, 208(2):261–281, 1980.
- [5] Goldin AL. Mechanisms of sodium channel inactivation. *Current Opinion in Neurobiology*, 13(3):284–290, 2003.
- [6] Lee A & Goldin AL. Role of the amino and carboxy termini in isoform-specific sodium channel variation. *The Journal of Physiology*, 586(16):3917–3926, 2008.
- [7] Nguyen HM & Goldin AL. Sodium channel carboxyl-terminal residue regulates fast inactivation. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(12):9077–9089, 2010.
- [8] Vanoye CG & Kunic JD & Ehring GR & George AL. Mechanism of sodium channel $\text{Na}_V1.9$ potentiation by G-protein signaling. *The Journal of General Physiology*, 141(2):193–202, 2013.
- [9] Ficker E & Obejero-Paz CA & Zhao S & Brown AM. The binding site for channel blockers that rescue misprocessed human long QT syndrome type 2 *ether-à-gogo*-related gene (HERG) mutations. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(7):4989–4998, 2002.
- [10] Gold MS & Levine JD & Correa AM. Modulation of TTX-R I_{Na} by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons *in vitro*. *The Journal of Neuroscience*, 18(24):10345–10355, 1998.
- [11] Cusdin FS & Nietlispach D & Maman J & Dale TJ & Powell AJ & Clare JJ & Jackson AP. The sodium channel $\beta 3$ -subunit induces multiphasic gating in $\text{Na}_V1.3$ and affects fast inactivation via distinct intracellular regions. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(43):33404–33412, 2010.
- [12] Copel C & Clerc N & Osorio N & Delmas P & Mazet B. The $\text{Na}_V1.9$ channel regulates colonic motility in mice. *Frontiers in Neuroscience*, 7(58):1–8, 2013.

- [13] Goldschen-Ohm MP & Capes DL & Oelstrom KM & Chanda B. Multiple pore conformations driven by asynchronous movements of voltage sensors in a eukaryotic sodium channel. *Nature Communications*, 4:1350, 2013.
- [14] Terlau H & Olivera BM. Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiological Reviews*, 84(1):41–68, 2004.
- [15] Sarhan MF & Van Petegem F & Ahern CA. A double tyrosine motif in the cardiac sodium channel domain III-IV linker couples calcium-dependent calmodulin binding to inactivation gating. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(48):33265–33274, 2009.
- [16] Bennett DLH & Woods CG. Painful and painless channelopathies. *Lancet Neurology*, 13(6):587–599, 2014.
- [17] Amaya F & Wang H & Costigan M & Allchorne AJ & Hatcher JP & Egerton J & Stean T & Morisset V & Grose D & Gunthorpe MJ & Chessell IP & Tate S & Green PJ & Woolf CJ. The voltage-gated sodium channel Nav1.9 is an effector of peripheral inflammatory pain hypersensitivity. *The Journal of Neuroscience*, 26(50):12852–12860, 2006.
- [18] Benn SC & Costigan M & Tate S & Fitzgerald M & Woolf CJ. Developmental expression of the TTX-Resistant voltage-gated sodium channels Nav1.8 (SNS) and Nav1.9 (SNS2) in primary sensory neurons. *The Journal of Neuroscience*, 21(16):6077–6085, 2001.
- [19] Mebs D. *Venomous and Poisonous Animals*. CRC Press, Boca Raton, 2002.
- [20] Savio-Galimberti E & Gollob MH & Darbar D. Voltage-gated sodium channels: biophysics, pharmacology, and related channelopathies. *Frontiers in Pharmacology*, 3(July):124, 2012.
- [21] Sotoodehnia N & Isaacs A & de Bakker PI & Dörr M & Newton-Cheh C & Nolte IM & van der Harst P & Müller M & Eijgelsheim M & Alonso A & Hicks AA & Padmanabhan S & Hayward C & Smith AV & Polasek O & Giovannone S & Fu J & Magnani JW & Marcianti KD & Pfeufer A & Gharib SA & Teumer A & Li M & Bis JC & Rivadeneira F & Aspelund T & Köttgen A & Johnson T & Rice K & Sie MP & Wang YA & Klopp N & Fuchsberger C & Wild SH & Mateo Leach I & Estrada K & Völker U & Wright AF & Asselbergs FW & Qu J & Chakravarti A & Sinner MF & Kors JA & Petersmann A & Harris TB & Soliman EZ & Munroe PB & Psaty BM & Oostra BA & Cupples LA & Perz S & de Boer RA & Uitterlinden AG & Völzke H & Spector TD & Liu FY & Boerwinkle E & Dominiczak AF & Rotter JI & van Herpen G & Levy D & Wichmann HE & van Gilst WH & Witteman JC & Kroemer HK & Kao WH & Heckbert SR & Meitinger T & Hofman A & Campbell H & Folsom AR & van Veldhuisen DJ & chwiebach C & O'Donnell CJ & Volpato CB & Caulfield MJ & Connell JM & Launer L & Lu X & Franke L & Fehrmann RS & te Meerman G & Groen HJ & Weersma RK & van den Berg LH & Wijmenga C & Ophoff RA & Navis G & Rudan I & Snieder H & Wilson JF & Pramstaller PP & Siscovick DS & Wang TJ & Gudnason V & van Duijn CM & Felix SB & Fishman GI & Jamshidi Y & Stricker BH & Samani NJ & Kääb S & Arking DE. Common variants

- in 22 loci are associated with QRS duration and cardiac ventricular conduction. *Nature Genetics*, 42(12):1068–1076, 2010.
- [22] Chambers JC & Zhao J & Terracciano CM & Bezzina CR & Zhang W & Kaba R & Navaratnarajah M & Lotlikar A & Sehmi JS & Kooner MK & Deng G & Siedlecka U & Parasramka S & El-Hamamsy I & Wass MN & Dekker LR & de Jong JS & Sternberg MJ & McKenna W & Severs NJ & de Silva R & Wilde AA & Anand P & Yacoub M & Scott J & Elliott P & Wood JN & Kooner JS. Genetic variation in SCN10A influences cardiac conduction. *Nature Genetics*, 42(2):149–152, 2010.
- [23] Bongiorno D & Schuetz F & Poronnik P & Adams DJ. Regulation of voltage-gated ion channels in excitable cells by the ubiquitin ligases Nedd4 and Nedd4-2. *Channels*, 5(1):71–80, 2011.
- [24] John VH & Main MJ & Powell AJ & Gladwell ZM & Hick C & Sidhu HS & Clare JJ & Tate S & Trezise DJ. Heterologous expression and functional analysis of rat Nav1.8 (SNS) voltage-gated sodium channels in the dorsal root ganglion neuroblastoma cell line ND7-23. *Neuropharmacology*, 46(3):425–438, 2004.
- [25] Yang T & Attack TC & Stroud DM & Zhang W & Hall L & Roden DM. Blocking Scn10a channels in heart reduces late sodium current and is antiarrhythmic. *Circulation Research*, 111(3):322–332, 2012.
- [26] Diss JKJ & Calissano M & Gascoyne D & Djamgoz MBA & Latchman DS. Identification and characterization of the promoter region of the Nav1.7 voltage-gated sodium channel gene (SCN9A). *Molecular and Cellular Neurosciences*, 37(3):537–47, 2008.
- [27] Jarvis MF & Honore P & Shieh CC & Chapman M & Joshi S & Zhan XF & Kort M & Carroll W & Marron B & Atkinson R & Thomas J & Liu D & Krambis M & Liu Y & Mcgaraughty S & Chu K & Roeloffs R & Zhong C & Mikusa JP & Hernandez G & Gauvin D & Wade C & Zhu C & Pai M & Scanio M & Shi L & Drizin I & Gregg R & Matulenko M & Hakeem A & Gross M & Johnson M & Marsh K & Wagoner PK & Sullivan JP & Faltynek CR & Krafte DS. A-803467, a potent and selective Nav1.8 sodium channel blocker, attenuates neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(20):8520–8525, 2007.
- [28] Lawrence JH & Orias DW & Balser JR & Nuss HB & Tomaselli GF & O’Rourke B & Marban E. Single-channel analysis of inactivation-defective rat skeletal muscle sodium channels containing the F1304Q mutation. *Biophysical Journal*, 71(3):1285–1294, 1996.
- [29] Leipold E. Characteristics of rNav1.4/hNav1.9 chimeras. unpubl.
- [30] Leipold E. Characteristics of rNav1.4/hNav2.1 chimeras. unpubl.
- [31] Leipold E. Characteristics of rNav1.4/mNav1.7 chimeras. unpubl.

- [32] Sakmann B & Neher E. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260(5554):799–802, 1976.
- [33] HEKA Elektronik. *EPC 10/EPC 10 USB Patch-Clamp Amplifiers Manual 2.4*. Lambrecht/Pfalz, 2007.
- [34] Gurdon JB et al. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*, 233(5316):177–182, 1971.
- [35] Tombola F & Pathak MM & Isacoff EY. How does voltage open an ion channel? *Annual Reviews of Cell and Developmental Biology*, 22:23–52, 2006.
- [36] Weiss J & Pyrski M & Jacobi E & Bufe B & Willnecker V & Schick B & Zizzari P & Gossage SJ & Greer CA & Leinders-Zufall T & Woods CG & Wood JN & Zufall F. Loss-of-function mutations in sodium channel $\text{Nav}1.7$ cause anosmia. *Nature*, 472(7342):186–190, 2011.
- [37] Hamill OP & Marty A & Neher E & Sakmann B & Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 391(2):85–100, 1981.
- [38] Bowsher D & Geoffrey WC & Nicholas AK & Carvalho OM & Haggett CE & Tedman B & Mackenzie JM & Crooks D & Mahmood N & Twomey JA & Hann S & Jones D & Wymer JP & Albrecht PJ & Argoff CE & Rice FL. Absence of pain with hyperhidrosis: a new syndrome where vascular afferents may mediate cutaneous sensation. *Pain*, 147(1-3):287–98, 2009.
- [39] Altier C & Garcia-Caballero A & Simms B & You H & Chen L & Walcher J & Tedford HW & Hermosilla T & Zamponi GW. The $\text{Ca}_v\beta$ subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels. *Nature Neuroscience*, 14(2):173–180, 2011.
- [40] Waxman SG & Zamponi GW. Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. *Nature Neuroscience*, 17(2):153–63, 2014.
- [41] Kim H & Sasaki T & Maeda K & Koya D & Kashiwagi A & Yasuda H. Protein kinase C β -selective inhibitor LY333531 attenuates diabetic hyperalgesia through ameliorating cGMP level of dorsal root ganglion neurons. *Diabetes*, 52(8):2102–2109, 2003.
- [42] Plummer NW & Meisler M H. Evolution and diversity of mammalian sodium channel genes. *Genomics*, 57(2):323–31, 1999.
- [43] Lipkind GM & Fozzard HA. KcsA crystal structure as framework for a molecular model of the Na^+ channel pore. *Biochemistry*, 40(23):6786–6794, 2000.
- [44] Satin J & Kyle JW & Chen M & Rogart RB & Fozzard HA. The cloned cardiac Na channel α -subunit expressed in *Xenopus* oocytes show gating and blocking properties of native channels. *The Journal of Membrane Biology*, 130(1):11–22, 1992.

- [45] Leipold E & Liebmann L & Korenke GC & Heinrich T & Giesselmann S & Baets J & Ebbinghaus M & Goral RO & Stöckberg T & Hennings JC & Bergmann M & Altmüller J & Thiele H & Wetzel A & Nürnberg P & Timmerman V & De Jonghe P & Blum R & Schaible HG & Weis J & Heinemann SH & Hübner CA & Kurth I. A *de novo* gain-of-function mutation in SCN11A causes loss of pain perception. *Nature Genetics*, 45(11):1399–1404, 2013.
- [46] Leipold E & Liebmann L & Korenke GC & Heinrich T & Giesselmann S & Baets J & Ebbinghaus M & Goral RO & Stöckberg T & Hennings JC & Bergmann M & Altmüller J & Thiele H & Wetzel A & Nürnberg P & Timmerman V & De Jonghe P & Blum R & Schaible HG & Weis J & Heinemann SH & Hübner CA & Kurth I. A *de novo* gain-of-function mutation in SCN11A causes loss of pain perception. unpubl.
- [47] Schirmeyer J. *Doktorarbeit*. 2014.
- [48] Stevens M & Peigneur S & Tytgat J. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. *Frontiers in Pharmacology*, 2(71):1–13, 2011.
- [49] Walker JR & Novick PA & Parsons WH & McGregor M & Zablocki J & Pande VS & Du Bois J. Marked difference in saxitoxin and tetrodotoxin affinity for the human nociceptive voltage-gated sodium channel (Na_v1.7). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(44):18102–18107, 2012.
- [50] Sleeper AA & Cummins TR & Dib-Hajj SD & Hormuzdiar W & Tyrrell L & Waxman SG & Black JA. Changes in expression of two tetrodotoxin-resistant sodium channels and their currents in dorsal root ganglion neurons after sciatic nerve injury but not rhizotomy. *The Journal of Neuroscience*, 20(19):7279–7289, 2000.
- [51] Raymond CK & Castle J & Garrett-Engle P & Armour CD & Kan Z & Tsinoremas N & Johnson JM. Expression of alternatively spliced sodium channel alpha-subunit genes. Unique splicing patterns are observed in dorsal root ganglia. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(44):46234–46241, 2004.
- [52] Baker MD & Chandra SY & Ding Y & Waxman SG & Wood JN. GTP-induced tetrodotoxin-resistant Na⁺ current regulates excitability in mouse and rat small diameter sensory neurones. *The Journal of Physiology*, 548(2):373–382, 2003.
- [53] Okuse K & Malik-Hall M & Baker MD & Poon WY & Kong H & Chao MV & Wood JN. Annexin II light chain regulates sensory neuron-specific sodium channel expression. *Nature*, 417(6889):653–656, 2002.
- [54] Sivilotti L & Okuse K & Akopian AN & Moss S & Wood JN. A single serine residue confers tetrodotoxin insensitivity on the rat sensory-neuron-specific sodium channel SNS. *FEBS Letters*, 409(1):49–52, 1997.

- [55] Narahashi T & Anderson NC & Moore JW. Tetrodotoxin does not block excitation from inside the nerve membrane. *Science*, 153(3737):765–767, 1966.
- [56] Zhang XY & Wen J & Yang W & Wang C & Gao L & Zheng LH & Wang T & Ran K & Li Y & Li X & Xu M & Luo J & Feng S & Ma X & Ma H & Chai Z & Zhou Z & Yao J & Zhang X & Liu JY. Gain-of-Function mutations in SCN11A cause familial episodic pain. *American Journal of Human Genetics*, 93(5):957–966, 2013.
- [57] Eriksson J & Fried K. Expression of the sodium channel transcripts Nav1.8 and Nav1.9 in injured dorsal root ganglion neurons of interferon- γ or interferon- γ receptor deficient mice. *Neuroscience Letters*, 338(3):242–246, 2003.
- [58] Higure Y & Katayama Y & Takeuchi K & Ohtsubo Y & Yoshii K. Lucifer Yellow slows voltage-gated Na⁺ current inactivation in a light-dependent manner in mice. *The Journal of Physiology*, 550(Pt 1):159–167, 2003.
- [59] Kamiya K & Kaneda M & Sugawara T & Mazaki E & Okamura N & Montal M & Makita N & Tanaka M & Fukushima K & Fujiwara T & Inoue Y & Yamakawa K. A nonsense mutation of the sodium channel gene SCN2A in a patient with intractable epilepsy and mental decline. *The Journal of Neuroscience*, 24(11):2690–2698, 2004.
- [60] Takeuchi K & Yoshii K. Effect of superoxide derived from Lucifer yellow CH on voltage-gated currents of mouse taste bud cells. *Chemical Senses*, 33(5):425–432, 2008.
- [61] Bosmans F & Puopolo M & Martin-Eauculaire MF & Bean BP & Swartz KJ. Functional properties and toxin pharmacology of a dorsal root ganglion sodium channel viewed through its voltage sensors. *The Journal of General Physiology*, 138(1):59–72, 2011.
- [62] Curtis HJ & Cole KS. Propagation of electrical signals along giant nerve fibers. *The Journal of General Physiology*, 21(6):757–765, 1938.
- [63] Favre I & Moczydlowski E & Schild L. Specificity for block by saxitoxin and divalent cations at a residue which determines sensitivity of sodium channel subtypes to guanidinium toxins. *The Journal of General Physiology*, 106(2):203–29, 1995.
- [64] Zhang ZN & Li Q & Liu C & Wang HB & Wang Q & Bao L. The voltage-gated Na⁺ channel Nav1.8 contains an ER-retention/retrieval signal antagonized by the β 3 subunit. *Journal of Cell Science*, 121(19):3243–3252, 2008.
- [65] Llewellyn LE. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Natural Product Reports.*, 23(2):200–222, 2006.
- [66] McEwen DP & Meadows LS & Chen C & Thyagarajan V & Isom LL. Sodium channel β 1 subunit-mediated modulation of Nav1.2 currents and cell surface density is dependent on interactions with contactin and ankyrin. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(16):16044–16049, 2004.

- [67] Patino GA & Isom LL. Electrophysiology and beyond: multiple roles of Na⁺ channel β subunits in development and disease. *Neuroscience Letters*, 486(2):53–59, 2010.
- [68] Rugiero F & Mistry M & Sage D & Black JA & Waxman SG & Crest M & Clerc N & Delmas P & Gola M. Selective expression of a persistent tetrodotoxin-resistant Na⁺ current and Nav1.9 subunit in myenteric sensory neurons. *The Journal of Neuroscience*, 23(7):2715–2725, 2003.
- [69] Subramanian N & Wetzel A & Dombert B & Yadav P & Havlicek S & Jablonka S & Nassar MA & Blum R & Sendtner M. Role of Nav1.9 in activity-dependent axon growth in motoneurons. *Human Molecular Genetics*, 21(16):3655–3667, 2012.
- [70] Vijayaragavan K & Acharfi S & Chahine M. The C-terminal region as a modulator of rNav1.7 and rNav1.8 expression levels. *FEBS Letters*, 559(1-3):39–44, 2004.
- [71] Östman JAR & Nassar MA & Wood JN & Baker MD. GTP up-regulated persistent Na⁺ current and enhanced nociceptor excitability require Nav1.9. *The Journal of Physiology*, 586(4):1077–1087, 2008.
- [72] Mendoza-Schulz A & Solano-Agama C & Arreola-Mendoza L & Reyes-Márquez B & Barbier O & Del Razo LM & Mendoza-Garrido ME. The effects of fluoride on cell migration, cell proliferation, and cell metabolism in GH4C1 pituitary tumour cells. *Toxicology Letters*, 190(2):179–186, 2009.
- [73] Burgess DL & Kohrman DC & Galt J & Plummer NW & Jones JM & Spear B & Meisler MH. Mutation of a new sodium channel gene, Scn8a, in the mouse mutant ‘motor endplate disease’. *Nature Genetics*, 10(4):461–465, 1995.
- [74] Kohrman DC & Smith MR & Goldin AL & Harris J & Meisler MH. A missense mutation in the sodium channel Scn8a is responsible for cerebellar ataxia in the mouse mutant jolting. *The Journal of Neuroscience*, 16(19):5993–5999, 1996.
- [75] Schulz DJ & Temporal S & Barry DM & Garcia ML. Mechanisms of voltage-gated ion channel regulation: from gene expression to localization. *Cellular and molecular life sciences*, 65(14):2215–31, 2008.
- [76] Copel C & Osorio N & Crest M & Gola M & Delmas P & Clerc N. Activation of neurokinin 3 receptor increases Nav1.9 current in enteric neurons. *The Journal of Physiology*, 587(7):1461–79, 2009.
- [77] Dascal N. Voltage clamp recordings from *Xenopus* oocytes. *Current Protocols in Neuroscience*, 2001.
- [78] Alberts B & Johnson A & Lewis J & Raff M & Roberts K & Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. Taylor & Francis, New York, 2008.

- [79] Coste B & Osorio N & Padilla F & Crest M & Delmas P. Gating and modulation of presumptive $\text{Na}_V1.9$ channels in enteric and spinal sensory neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 26(1):123–134, 2004.
- [80] Maingret F & Coste B & Padilla F & Clerc N & Crest M & Korogod SM & Delmas P. Inflammatory mediators increase $\text{Na}_V1.9$ current and excitability in nociceptors through a coincident detection mechanism. *Journal of General Physiology*, 131(3):211–225, 2008.
- [81] Zimmermann K & Leffler A & Babes A & Cendan CM & Carr RW & Kobayashi J & Nau C & Wood JN & Reeh PW. Sensory neuron sodium channel $\text{Na}_V1.8$ is essential for pain at low temperatures. *Nature*, 447(7146):856–859, 2007.
- [82] Wetzel A & Jablonka S & Blum R. Cell-autonomous axon growth of young motoneurons is triggered by a voltage-gated sodium channel. *Channels (Austin)*, 7(1):51–56, 2013.
- [83] Zimmer T & Surber R. SCN5A channelopathies - An update on mutations and mechanisms. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 98(2-3):120–136, 2008.
- [84] Rohl CA & Boeckman FA & Baker C & Scheuer T & Catterall WA & Klevit RE. Solution structure of the sodium channel inactivation gate. *Biochemistry*, 38(3):855–861, 1999.
- [85] Zhang H & Kolibal S & Vanderkooi JM & Cohen SA & Kallen RG. A carboxy-terminal α -helical segment in the rat skeletal muscle voltage-dependent Na^+ channel is responsible for its interaction with the amino-terminus. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1467(2):406–418, 2000.
- [86] Hillsley K & Lin JH & Stanisz A & Grundy D & Aerssens J & Peeters PJ & Moechars D & Coulie B & Stead RH. Dissecting the role of sodium currents in visceral sensory neurons in a model of chronic hyperexcitability using $\text{Na}_V1.8$ and $\text{Na}_V1.9$ null mice. *The Journal of Physiology*, 576(1):257–267, 2006.
- [87] Becker S & Prusak-Sochaczewski E & Zamponi G & Beck-Sickinger AG & Gordon RD & French RJ. Action of derivatives of μ -conotoxin GIIIA on sodium channels. Single amino acid substitutions in the toxin separately affect association and dissociation rates. *Biochemistry*, 31(35):8229–8238, 1992.
- [88] Fotia AB & Ekberg Jenny & Adams DJ & Cook DI & Poronnik P & Kumar S. Regulation of neuronal voltage-gated sodium channels by the ubiquitin-protein ligases Nedd4 and Nedd4-2. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(28):28930–28935, 2004.
- [89] Heinemann SH & Terlau H & Stühmer W & Imoto K & Numa S. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature*, 356(6368):441–443, 1992.
- [90] Terlau H & Heinemann SH & Stühmer W & Pusch M & Conti F & Imoto K & Numa S. Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Letters*, 293(1-2):93–96, 1991.

- [91] Cannon SC. From mutation to myotonia in sodium channel disorders. *Neuromuscular Disorders*, 7(4):241–249, 1997.
- [92] Choi JS & Tyrrell L & Waxman SG & Dib-Hajj SD. Functional role of the C-terminus of voltage-gated sodium channel $\text{Na}_V1.8$. *FEBS Letters*, 572(1-3):256–260, 2004.
- [93] Black JA & Vasylyev D & Dib-Hajj SD & Waxman SG. $\text{Na}_V1.9$ expression in magnocellular neurosecretory cells of *supraoptic nucleus*. *Experimental Neurology*, 253:174–179, 2014.
- [94] Catterall WA & Goldin AL & Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4):397–409, 2005.
- [95] Cummins TR & Black JA & Dib-Hajj SD & Waxman SG. Glial-derived neurotrophic factor upregulates expression of functional SNS and NaN sodium channels and their currents in axotomized dorsal root ganglion neurons. *The Journal of Neuroscience*, 20(23):8754–8761, 2000.
- [96] Cummins TR & Dib-Hajj SD & Black JA & Akopian AN & Wood JN & Waxman SG. A novel persistent tetrodotoxin-resistant sodium current in SNS-null and wild-type small primary sensory neurons. *The Journal of Neuroscience*, 19(24):RC43, 1999.
- [97] Dib-Hajj S & Black JA & Cummins TR & Waxman SG. NaN/ $\text{Na}_V1.9$: A sodium channel with unique properties. *Trends in Neurosciences*, 25(5):253–259, 2002.
- [98] Dib-Hajj SD & Tyrrell L & Black JA & Waxman SG. NaN, a novel voltage-gated Na channel, is expressed preferentially in peripheral sensory neurons and down-regulated after axotomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(15):8963–8968, 1998.
- [99] Dib-Hajj SD & Waxman SG. Isoform-specific and pan-channel partners regulate trafficking and plasma membrane stability; and alter sodium channel gating properties. *Neuroscience Letters*, 486(2):84–91, 2010.
- [100] Dib-Hajj SD & Yang Y & Black JA & Waxman SG. The $\text{Na}_V1.7$ sodium channel: from molecule to man. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(1):49–62, 2013.
- [101] Fjell J & Cummins TR & Dib-Hajj SD & Fried K & Black JA & Waxman SG. Differential role of GDNF and NGF in the maintenance of two TTX-resistant sodium channels in adult DRG neurons. *Molecular Brain Research*, 67(2):267–282, 1999.
- [102] Hains BC & Klein JP & Saab CY & Craner MJ & Black JA & Waxman SG. Upregulation of sodium channel $\text{Na}_V1.3$ and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience*, 23(26):8881–8892, 2003.

- [103] Herzog RI & Cummins TR & Ghassemi F & Dib-Hajj SD & Waxman SG. Distinct repriming and closed-state inactivation kinetics of Na_v1.6 and Na_v1.7 sodium channels in mouse spinal sensory neurons. *The Journal of Physiology*, 551(Pt 3):741–50, 2003.
- [104] Huang J & Han C & Estacion M & Vasylyev D & Hoeijmakers JGJ & Gerrits MM & Tyrrell L & Lauria G & Faber CG & Dib-Hajj SD & Merkies ISJ & Waxman SG. Gain-of-function mutations in sodium channel Na_v1.9 in painful neuropathy. *Brain*, 137(Pt 6):1627–42, 2014.
- [105] Liu CJ & Dib-Hajj SD & Black JA & Greenwood J & Lian Z & Waxman SG. Direct interaction with contactin targets voltage-gated sodium channel Na_v1.9/NaN to the cell membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(49):46553–46561, 2001.
- [106] Liu CJ & Dib-Hajj SD & Waxman SG. Fibroblast growth factor homologous factor 1B binds to the C-terminus of the tetrodotoxin-resistant sodium channel rNa_v1.9 (NaN). *The Journal of Biological Chemistry*, 276(22):18925–18933, 2001.
- [107] Rush AM & Waxman SG. PGE2 increases the tetrodotoxin-resistant Na_v1.9 sodium current in mouse DRG neurons via G-proteins. *Brain Research*, 1023(2):264–271, 2004.
- [108] Tyrrell L & Renganathan M & Dib-Hajj SD & Waxman SG. Glycosylation alters steady-state inactivation of sodium channel Na_v1.9/NaN in dorsal root ganglion neurons and is developmentally regulated. *The Journal of Neuroscience*, 21(24):9629–9637, 2001.
- [109] Heinemann SH. Persönliche Gespräche. 2010.
- [110] Kassmann M & Hansel A & Leipold E & Birkenbeil J & Lu SQ & Hoshi T & Heinemann SH. Oxidation of multiple methionine residues impairs rapid sodium channel inactivation. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 456(6):1085–1095, 2008.
- [111] Kolbe K & Schönherr R & Gessner G & Sahoo N & Hoshi T & Heinemann SH. Cysteine 723 in the C-linker segment confers oxidative inhibition of hERG1 potassium channels. *The Journal of Physiology*, 588(Pt 16):2999–3009, 2010.
- [112] Leipold E & Borges A & Heinemann SH. Scorpion β -toxin interference with Na_v channel voltage sensor gives rise to excitatory and depressant modes. *The Journal of General Physiology*, 139(4):305–319, 2012.
- [113] Leipold E & DeBie H & Zorn S & Borges A & Olivera BM & Terlau H & Heinemann SH. μ O-conotoxins inhibit Na_v channels by interfering with their voltage sensors in domain-2. *Channels*, 1(4):253–262, 2007.
- [114] Leipold E & Markgraf R & Miloslavina A & Kijas M & Schirmeyer J & Imhof D & Heinemann SH. Molecular determinants for the subtype specificity of μ -conotoxin SIIIA targeting neuronal voltage-gated sodium channels. *Neuropharmacology*, 61(1-2):105–111, 2011.

- [115] Markgraf R & Leipold E & Schirmeyer J & Paolini-Bertrand M & Hartley O & Heinemann SH. Mechanism and molecular basis for the sodium channel subtype specificity of μ -conopeptide CnIIIC. *British Journal of Pharmacology*, 167(3):576–586, 2012.
- [116] Ojha NK & Nematian-Ardestani E & Neugebauer S & Borowski B & El-Hussein A & Hoshi T & Leipold E & Heinemann SH. Sodium channels as gateable non-photonics sensors for membrane-delimited reactive species. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838(5):1412–1419, 2014.
- [117] Sahoo N & Schönherr R & Hoshi T & Heinemann SH. Cysteines control the N- and C-linker-dependent gating of KCNH1 potassium channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1818(5):1187–1195, 2012.
- [118] Schirmeyer J & Szafranski K & Leipold E & Mawrin C & Platzer M & Heinemann SH. A subtle alternative splicing event of the $\text{Na}_v1.8$ voltage-gated sodium channel is conserved in human, rat, and mouse. *Journal of Molecular Neuroscience*, 41(2):310–314, 2010.
- [119] Schirmeyer J & Szafranski K & Leipold E & Mawrin C & Platzer M & Heinemann SH. Exon 11 skipping of SCN10A coding for voltage-gated sodium channels in dorsal root ganglia. *Channels*, 8(3):Epub ahead of print, 2014.
- [120] Zorn S & Leipold E & Hansel A & Bulaj G & Olivera BM & Terlau H & Heinemann SH. The μ O-conotoxin MrVIA inhibits voltage-gated sodium channels by associating with domain-3. *FEBS Letters*, 580(5):1360–1364, 2006.
- [121] Beyak MJ & Ramji Noor & Krol KM & Kawaja MD & Vanner SJ. Two TTX-resistant Na^+ currents in mouse colonic dorsal root ganglia neurons and their role in colitis-induced hyperexcitability. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 287(4):845–855, 2004.
- [122] Goldin AL & Meisler MH. Spanpanato J & Kearney JA & de Haan G & McEwen DP & Escayg A & Aradi I & MacDonald BT & Levin SI & Soltesz I & Benna P & Montalenti E & Isom LL. A novel epilepsy mutation in the sodium channel SCN1A identifies a cytoplasmic domain for beta subunit interaction. *The Journal of Neuroscience*, 24(44):10022–10034, 2004.
- [123] Puhl HL & Ikeda SR. Identification of the sensory neuron specific regulatory region for the mouse gene encoding the voltage-gated sodium channel $\text{Na}_v1.8$. *Journal of Neurochemistry*, 106(3):1209–1224, 2008.
- [124] Lee JH & Park CK & Chen G & Han Q & Xie RG & Liu T & Ji RR & Lee SY. A monoclonal antibody that targets a $\text{Na}_v1.7$ channel voltage sensor for pain and itch relief. *Cell*, 157(6):1–12, 2014.
- [125] Roy ML & Narahashi T. Differential properties of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of Neuroscience*, 12(6):2104–2111, 1992.

- [126] Herzog RI & Liu CJ & Waxman SG & Cummins TR. Calmodulin binds to the C terminus of sodium channels Nav1.4 and Nav1.6 and differentially modulates their functional properties. *The Journal of Neuroscience*, 23(23):8261–70, 2003.
- [127] Ulbricht W. Sodium channel inactivation: molecular determinants and modulation. *Physiological Reviews*, 85(4):1271–301, 2005.
- [128] Cantrell AR & Catterall WA. Neuromodulation of Na⁺ channels: an unexpected form of cellular plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(6):397–407, 2001.
- [129] Catterall WA. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *The Journal of Physiology*, 590(11):2577–2589, 2012.
- [130] Goldin AL & Barchi RL & Caldwell JH & Hofmann F & Howe JR & Hunter JC & Kallen RG & Mandel G & Meisler MH & Netter YB & Noda M & Tamkun MM & Waxman SG & Wood JN & Catterall WA. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 28(2):365–368, 2000.
- [131] Payandeh J & Scheuer T & Zheng N & Catterall WA. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*, 475(7356):353–358, 2011.
- [132] Ratcliffe CF & Westenbroek R & Curtis R & Catterall WA. Sodium channel $\beta 1$ and $\beta 3$ subunits associate with neurofascin through their extracellular immunoglobulin-like domain. *The Journal of Cell Biology*, 154(2):427–434, 2001.
- [133] West JW & Patton DE & Scheuer T & Wang Y & Goldin AL & Catterall WA. A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁺-channel inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(22):10910–10914, 1992.
- [134] Yu FH & Catterall WA. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology*, 4(3):207, 2003.
- [135] Priest BT & Murphy BA & Lindia JA & Diaz C & Abbadie C & Ritter AM & Liberator P & Iyer LM & Kash SF & Kohler MG & Kaczorowski GJ & MacIntyre DE & Martin WJ. Contribution of the tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel Nav1.9 to sensory transmission and nociceptive behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26):9382–9387, 2005.
- [136] Stephan MM & Potts JF & Agnew WS. The μI skeletal muscle sodium channel: mutation E403Q eliminates sensitivity to tetrodotoxin but not to μ -conotoxins GIIIA and GIIIB. *The Journal of Membrane Biology*, 137(1):1–8, 1994.
- [137] Chahine M & Ziane R & Vijayaragavan K & Okamura Y. Regulation of Nav channels in sensory neurons. *Trends in pharmacological sciences*, 26(10):496–502, 2005.

- [138] Narahashi T & Deguchi T & Urakawa N & Ohkubo Y. Stabilization and rectification of muscle fiber membrane by tetrodotoxin. *The American Journal of Physiology*, 198(1):934–938, 1960.

7 Anhang

Tabelle 7.1: Übersicht der Parameter von Kanalaktivierung V_m , k_m und E_{rev} sowie Kanalaktivierung V_h und K_h der Na_V -Kanäle und Kanalchimären untersucht mit TEVC. Die Zahlen repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes von n unabhängigen Experimenten.

| Kanal | V_m (mV) | k_m (mV) | E_{rev} (mV) | $n=$ | V_h (mV) | k_h (mV) | $n=$ |
|----------------------|-----------------|----------------|-------------------|------|-----------------|----------------|-------|
| 4444 | -32.7 ± 1.2 | 4.6 ± 0.5 | \pm | 8 | -49.4 ± 0.5 | 4.8 ± 0.04 | 19 |
| hNa _V 1.7 | -29.5 ± 0.9 | 7.6 ± 0.7 | \pm | 10 | -66.2 ± 1.4 | 5.8 ± 0.1 | 7 |
| hNa _V 1.8 | -3.1 ± 0.7 | 20.9 ± 1.9 | \pm | 8 | -53.0 ± 1.0 | 11.6 ± 0.4 | 9 |
| 9444 | -19.5 ± 1.3 | 14.4 ± 1.2 | 48.0 ± 1.0 | 5 | -68.7 ± 3.3 | 13.1 ± 3.3 | 5 |
| 4944 | 16.8 ± 1.1 | 19.1 ± 1.0 | 41.1 ± 1.4 | 11 | -82.3 ± 0.6 | 9.7 ± 0.6 | 9 |
| 44(94)4 | -41.2 ± 1.0 | 6.3 ± 0.5 | 45.3 ± 4.3 | 6 | -66.9 ± 0.3 | 6.2 ± 0.3 | 8 |
| 4449 | -21.3 ± 0.3 | 7.1 ± 0.2 | 50.7 ± 0.9 | 9 | -22.9 ± 0.3 | 5.3 ± 0.2 | 7 |
| 4449_C4 | -33.0 ± 0.6 | 8.0 ± 0.4 | 50.3 ± 1.6 | 13 | -45.5 ± 0.7 | 5.7 ± 0.1 | 12 |
| 4444_C9 | -19.7 ± 0.4 | 5.3 ± 0.1 | 47.4 ± 1.0 | 14 | -29.9 ± 0.4 | 5.1 ± 0.1 | 14 |
| 9999_C4 | -31.7 ± 1.2 | 24.9 ± 1.0 | 39.1 ± 3.2 | 16 | -82.7 ± 2.0 | 20.6 ± 0.5 | 3 |
| 9999_C4_L811P | -66.3 ± 1.5 | 20.0 ± 0.8 | 7.8 ± 1.4 | 8 | n. d. | n. d. | n. d. |
| 9999_C4_L811P_SY | -67.7 ± 1.4 | 23.8 ± 3.1 | 15.3 ± 3.7 | 6 | n. d. | n. d. | n. d. |

Tabelle 7.2: Übersicht der Parameter von Kanalaktivierung V_m und k_m der IFC-Mutanten von Na_V -Kanälen und Kanalchimären untersucht mit TEVC vor und nach Applikation von 100 μ M DTNP. Die Zahlen repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes von n unabhängigen Experimenten.

| Kanal | Kontrolle | | | mit DTNP | | |
|----------------|-----------------|----------------|------|-----------------|----------------|------|
| | V_m (mV) | k_m (mV) | $n=$ | V_m (mV) | k_m (mV) | $n=$ |
| 4444_IFC | -26.4 ± 1.1 | 9.4 ± 0.9 | 8 | -28.1 ± 0.8 | 7.0 ± 0.8 | 5 |
| 9444_IFC | -17.5 ± 1.0 | 14.5 ± 1.0 | 6 | -18.9 ± 0.9 | 10.9 ± 0.5 | 6 |
| 4944_IFC | n. d. | n. d. | 9 | 14.9 ± 0.5 | 16.3 ± 0.5 | 9 |
| 4449_IFC | -20.2 ± 0.6 | 7.4 ± 0.2 | 7 | -19.3 ± 0.9 | 6.7 ± 0.5 | 5 |
| 9999_C4_IFC | -22.1 ± 3.3 | 23.5 ± 2.2 | 7 | -10.7 ± 0.8 | 24.4 ± 0.9 | 7 |
| 9999_C4_IFC_SY | -18.5 ± 3.6 | 20.8 ± 2.4 | 5 | -21.7 ± 2.4 | 15.9 ± 1.3 | 5 |

Tabelle 7.3: Übersicht des Parameters Inaktivierungszeitkonstante τ_h der Na_v-Kanäle und Kalchimären untersucht mit TEVC. Die Zahlen repräsentieren Mittelwerte $\bar{X} \pm$ Standardfehler des Mittelwertes σ_n von n unabhängigen Experimenten.

| | 4444 | | 9444 | | 4944 | | 44(94)4 | |
|-------------------------|--------------------------------|----|--------------------------------|----|--------------------------------|----|--------------------------------|----|
| Membranspannung (mV) | $\bar{X} \pm \sigma_n$ (ms) | n= | $\bar{X} \pm \sigma_n$ (ms) | n= | $\bar{X} \pm \sigma_n$ (ms) | n= | $\bar{X} \pm \sigma_n$ (ms) | n= |
| -40 | | | | | | | 4.8±0.9 | 5 |
| -30 | 5.7±0.4 | 3 | | | | | 2.5±0.6 | 5 |
| -20 | 2.2±0.1 | 3 | 5.5±0.8 | 5 | | | | |
| -10 | | | 5.3±0.4 | 5 | | | | |
| 0 | | | 5.1±0.3 | 5 | | | | |
| 10 | | | 5.0±0.4 | 5 | 20.7±2.1 | 8 | | |
| 20 | | | 4.1±0.2 | 5 | 11.0±0.7 | 8 | | |
| 40 | | | | | 3.1±0.1 | 8 | | |

| | 4449 | | 4449_C4 | | 4444_C9 | | 9999_C4 | |
|-------------------------|--------------------------------|----|--------------------------------|----|--------------------------------|----|--------------------------------|----|
| Membranspannung (mV) | $\bar{X} \pm \sigma_n$ (ms) | n= | $\bar{X} \pm \sigma_n$ (ms) | n= | $\bar{X} \pm \sigma_n$ (ms) | n= | $\bar{X} \pm \sigma_n$ (ms) | n= |
| -40 | | | | | | | 9.1±0.6 | 6 |
| -30 | | | 6.2±0.5 | 4 | | | 7.7±0.3 | 6 |
| -20 | 9.6±0.5 | 9 | 2.9±0.2 | 4 | 10.6±0.4 | 13 | 7.1±0.3 | 6 |
| -10 | 7.4±0.4 | 9 | | | 4.7±0.2 | 13 | 8.8±0.6 | 6 |
| 0 | 3.9±0.2 | 9 | | | 2.9±0.1 | 13 | 11.1±1.0 | 6 |
| 10 | | | | | | | 11.1±1.2 | 6 |

Tabelle 7.4: Übersicht des Parameters Inaktivierungszeitkonstante τ_h der Kanalchimäre 9999_C4_L811P untersucht mit TEVC. Die Zahlen repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes von n unabhängigen Experimenten.

| Membranspannung (mV) | τ_h (ms) | n= |
|-------------------------|-------------------|----|
| -70 | 665.7 \pm 320.2 | 8 |
| -60 | 300.6 \pm 160.0 | 8 |
| -50 | 31.5 \pm 3.7 | 8 |
| -40 | 21.7 \pm 1.5 | 8 |
| -30 | 16.5 \pm 1.0 | 8 |
| -20 | 16.6 \pm 1.5 | 8 |
| -10 | 31.0 \pm 6.3 | 8 |

Tabelle 7.5: Übersicht der Parameter von Kanalaktivierung V_m , k_m und E_{rev} der inaktivierungsdefizienten IQM-Mutanten von Na_V -Kanälen und Kanalchimären untersucht mit TEVC. Die Zahlen repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes von n unabhängigen Experimenten.

| Kanal | V_m (mV) | k_m (mV) | E_{rev} (mV) | n= |
|-------------|-----------------|----------------|-------------------|----|
| 4444_IQM | -31.5 \pm 0.6 | 6.1 \pm 0.3 | 47.8 \pm 1.1 | 8 |
| 9999_C4_IQM | -31.0 \pm 1.1 | 16.9 \pm 5.5 | 31.7 \pm 1.0 | 8 |

Tabelle 7.6: Übersicht der verbliebenen Stromamplitude der inaktivierungsdefizienten Kanäle 4444_IQM und 9999_C4_IQM am Ende des 50 ms-Testpulses als Verhältnis aus I_{End}/I_{min} bei den angezeigten Membranspannungen. Die Zahlen repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes von n unabhängigen Experimenten.

| Membranspannung (mV) | 4444_IQM | 9999_C4_IQM | n= |
|-------------------------|---------------------|--------------------|----|
| -30 | 0.675 \pm 0.0255 | 0.731 \pm 0.0493 | 8 |
| -20 | 0.696 \pm 0.00859 | 0.882 \pm 0.0283 | 8 |
| -10 | 0.629 \pm 0.00974 | 0.901 \pm 0.0267 | 8 |
| 0 | 0.513 \pm 0.0151 | 0.83 \pm 0.0408 | 8 |
| 10 | 0.429 \pm 0.0273 | 0.783 \pm 0.0471 | 8 |
| 20 | 0.344 \pm 0.0388 | 0.7 \pm 0.0572 | 8 |

Tabelle 7.7: Übersicht der Inhibierung der Stromamplitude der Kanäle 4444_IQM und 9999_C4_IQM_SY durch verschiedene TTX-Konzentrationen. Die Zahlen repräsentieren Mittelwerte von $p_{\text{Block}} \pm$ Standardfehler des Mittelwertes von n unabhängigen Experimenten.

| TTX-Konzentration | 4444_IQM | | 9999_C4_IQM_SY | |
|-------------------|--------------------|----|--------------------|----|
| (nM) | p_{Block} | n= | p_{Block} | n= |
| 1 | 0.117 ± 0.025 | 5 | 0.143 ± 0.025 | 8 |
| 5 | 0.213 ± 0.013 | 5 | 0.511 ± 0.083 | 5 |
| 10 | 0.401 ± 0.052 | 5 | 0.596 ± 0.041 | 6 |
| 20 | 0.496 ± 0.048 | 6 | 0.778 ± 0.051 | 4 |
| 100 | 0.884 ± 0.047 | 5 | 1 ± 0 | 12 |

Tabelle 7.8: Übersicht der Inhibierung der Stromamplitude der Kanäle 4444_IQM und 9999_C4_IQM_SY durch verschiedene STX-Konzentrationen. Die Zahlen repräsentieren Mittelwerte von $p_{\text{Block}} \pm$ Standardfehler des Mittelwertes von n unabhängigen Experimenten.

| STX-Konzentration | 4444_IQM | | 9999_C4_IQM_SY | |
|-------------------|--------------------|----|--------------------|----|
| (nM) | p_{Block} | n= | p_{Block} | n= |
| 1.86 | 0.485 ± 0.115 | 6 | 0.423 ± 0.040 | 4 |
| 3.72 | 0.612 ± 0.064 | 3 | 0.460 ± 0.006 | 3 |
| 18.6 | 0.882 ± 0.038 | 4 | 0.825 ± 0.030 | 3 |
| 185.5 | 1 ± 0 | 3 | 1 ± 0 | 3 |
| 465 | 1 ± 0 | 3 | 1 ± 0 | 3 |

Tabelle 7.9: Übersicht der Inhibierung der Stromamplitude von 4444_IQM und 9999_C4_IQM durch 10 μM μSIIIA in *Xenopus*-Oozyten untersucht mit TEVC. Die Zahlen repräsentieren Mittelwerte von τ_{on} sowie $p_{\text{Block}} \pm$ Standardfehler des Mittelwertes von n unabhängigen Experimenten.

| | τ_{on} (s) | p_{Block} | n= |
|-------------|---------------------------|--------------------|----|
| 4444_IQM | 49.1 ± 4.5 | 0.909 ± 0.025 | 5 |
| 9999_C4_IQM | n. d. | 0.042 ± 0.012 | 5 |

Tabelle 7.10: Übersicht der Parameter von Kanalaktivierung V_m , k_m und E_{rev} der Na_v -Kanäle und Kanalchimären untersucht mit Patch-Clamp in ND7/23-Zellen. Die Zahlen repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes von n unabhängigen Experimenten. Die Werte von IFC-Mutanten wurden gewonnen mit Patch-Clamp-Experimenten in Anwesenheit von 200 μ M Lucifer Yellow vor und nach Bestrahlung (*) mit 450-490 nm Blaulicht.

| Kanal | V_m (mV) | k_m (mV) | E_{rev} (mV) | $n=$ |
|----------------------|-----------------|----------------|-------------------|------|
| 4444_YS | -35.6 \pm 1.4 | 7.4 \pm 0.6 | 45.8 \pm 2.1 | 7 |
| hNa _v 1.8 | -16.3 \pm 2.9 | 14.4 \pm 1.1 | 42.3 \pm 1.5 | 5 |
| 9999 | -63.9 \pm 2.6 | 13.2 \pm 0.9 | 40.5 \pm 2.3 | 13 |
| 9999_L811P | -86.9 \pm 2.8 | 11.9 \pm 0.8 | 34.6 \pm 1.5 | 11 |
| 9999_IFC | -63.1 \pm 3.5 | 11.4 \pm 0.6 | 40.3 \pm 1.7 | 6 |
| 9999_IFC* | -63.1 \pm 4.0 | 13.3 \pm 1.1 | 41.5 \pm 2.2 | 5 |
| 9999_IQM | -47.0 \pm 3.7 | 16.6 \pm 1.8 | 38.2 \pm 3.5 | 3 |
| 9999_C4 | -68.8 \pm 2.3 | 11.8 \pm 0.6 | 37.2 \pm 1.5 | 13 |
| 9999_C4_L811P | -96.0 \pm 1.8 | 11.9 \pm 1.0 | 29.0 \pm 2.8 | 7 |
| 9999_C4_IFC | -59.8 \pm 3.7 | 17.6 \pm 2.1 | 34.9 \pm 1.7 | 5 |
| 9999_C4_IFC* | -63.9 \pm 3.8 | 13.5 \pm 0.6 | 40.1 \pm 1.2 | 5 |
| 9999_C4_L811P_IFC | -86.4 \pm 2.3 | 15.7 \pm 0.8 | 32.1 \pm 1.9 | 5 |
| 9999_C4_L811P_IFC* | -93.4 \pm 2.6 | 13.6 \pm 0.6 | 29.5 \pm 2.1 | 6 |
| 4444_C9_YS | -26.6 \pm 1.3 | 9.3 \pm 0.7 | 44.0 \pm 1.7 | 9 |

Tabelle 7.11: Übersicht der Parameter von Kanalinaktivierung V_h und K_h der Na_v -Kanäle und Kanalchimären untersucht mit Patch-Clamp in ND7/23-Zellen. Die Zahlen repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes von n unabhängigen Experimenten. Die Werte von IFC-Mutanten wurden gewonnen mit Experimenten in Anwesenheit von 200 μ M Lucifer Yellow vor und nach Bestrahlung (*) mit 450-490 nm Blaulicht.

| Kanal | V_h (mV) | k_h (mV) | $n=$ |
|----------------------|------------------|----------------|------|
| 4444_YS | -68.4 \pm 2.7 | 5.0 \pm 0.2 | 8 |
| hNa _v 1.8 | -73.2 \pm 1.4 | 8.2 \pm 0.2 | 5 |
| 9999 | -56.9 \pm 0.6 | 8.9 \pm 0.5 | 10 |
| 9999_L811P | -54.4 \pm 1.4 | 15.7 \pm 1.4 | 9 |
| 9999_IFC | -53.5 \pm 1.7 | 8.2 \pm 0.7 | 4 |
| 9999_IFC* | -54.7 \pm 3.8 | 8.4 \pm 0.6 | 3 |
| 9999_C4 | -101.3 \pm 1.2 | 10.4 \pm 0.6 | 6 |
| 9999_C4_L811P | -123.5 \pm 1.4 | 10.4 \pm 0.6 | 6 |
| 9999_C4_IFC | -89.9 \pm 3.5 | 12.4 \pm 0.8 | 6 |
| 9999_C4_IFC* | -49.2 \pm 2.4 | 9.2 \pm 1.0 | 4 |
| 4444_C9_YS | -48.8 \pm 1.8 | 6.9 \pm 1 | 8 |

Tabelle 7.12: Übersicht der verbliebenen Stromamplitude im Verhältnis zum Stromextremum ($I_{\text{End}}/I_{\text{min}}$) am Ende des 80 ms-Testpulses in Abhängigkeit von der Membranspannung von Na_V -Kanälen und Kanalchimären untersucht mit Patch-Clamp in ND7/23-Zellen. Die Zahlen repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes von n unabhängigen Experimenten. Die Werte von 9999_C4, 9999_IFC sowie 9999_C4_IFC wurden gewonnen mit Experimenten in Anwesenheit von 200 μM Lucifer Yellow vor und nach Bestrahlung (*) mit 450-490 nM Blaublicht.

| Membran- spannung (mV) | 9999_C4 | n= | 9999_C4* | n= | 9999_IFC | n= | 9999_IFC* | n= |
|------------------------------|-------------------|----|-------------------|----|-------------------|----|-------------------|----|
| -70 | 0.106 \pm 0.026 | 4 | 0.144 \pm 0.038 | 4 | 0.955 \pm 0.074 | 6 | 0.679 \pm 0.140 | 5 |
| -60 | 0.078 \pm 0.020 | 4 | 0.125 \pm 0.022 | 4 | 0.778 \pm 0.070 | 6 | 0.733 \pm 0.057 | 5 |
| -50 | 0.075 \pm 0.012 | 4 | 0.104 \pm 0.019 | 4 | 0.626 \pm 0.055 | 6 | 0.671 \pm 0.081 | 5 |
| -40 | 0.069 \pm 0.012 | 4 | 0.089 \pm 0.019 | 4 | 0.523 \pm 0.057 | 6 | 0.646 \pm 0.042 | 5 |
| -30 | 0.061 \pm 0.019 | 4 | 0.080 \pm 0.018 | 4 | 0.307 \pm 0.050 | 6 | 0.479 \pm 0.014 | 5 |
| -20 | 0.047 \pm 0.019 | 4 | 0.069 \pm 0.020 | 4 | 0.217 \pm 0.046 | 6 | 0.368 \pm 0.027 | 5 |
| -10 | | | | | 0.171 \pm 0.041 | 5 | 0.314 \pm 0.030 | 5 |
| 0 | | | | | 0.157 \pm 0.058 | 5 | 0.291 \pm 0.029 | 5 |
| 10 | | | | | 0.177 \pm 0.079 | 3 | 0.217 \pm 0.025 | 5 |

| Membran- spannung (mV) | 9999 | n= | 9999_IQM | n= | 9999_C4_IFC | n= | 9999_C4_IFC* | n= |
|------------------------------|-------------------|----|-------------------|----|-------------------|----|-------------------|----|
| -70 | 0.735 \pm 0.042 | 14 | | | | | 0.925 \pm 0.039 | 4 |
| -60 | 0.793 \pm 0.026 | 14 | | | 0.232 \pm 0.105 | 5 | 0.949 \pm 0.017 | 5 |
| -50 | 0.736 \pm 0.032 | 14 | 0.962 \pm 0.014 | 3 | 0.274 \pm 0.064 | 5 | 0.963 \pm 0.020 | 5 |
| -40 | 0.577 \pm 0.031 | 14 | 0.996 \pm 0.022 | 3 | 0.269 \pm 0.052 | 5 | 0.958 \pm 0.027 | 5 |
| -30 | 0.368 \pm 0.028 | 14 | 0.966 \pm 0.037 | 3 | 0.223 \pm 0.050 | 5 | 0.931 \pm 0.035 | 5 |
| -20 | 0.268 \pm 0.024 | 14 | 0.970 \pm 0.022 | 3 | 0.209 \pm 0.053 | 5 | 0.902 \pm 0.038 | 5 |
| -10 | 0.220 \pm 0.023 | 14 | 0.944 \pm 0.031 | 3 | 0.178 \pm 0.054 | 5 | 0.891 \pm 0.038 | 5 |
| 0 | 0.173 \pm 0.051 | 14 | 0.927 \pm 0.014 | 3 | 0.187 \pm 0.050 | 4 | 0.868 \pm 0.043 | 5 |
| 10 | | | 0.855 \pm 0.019 | 3 | 0.099 \pm 0.086 | 4 | 0.837 \pm 0.055 | 5 |

Tabelle 7.13: Übersicht der verbliebenen Stromamplitude im Verhältnis zum Stromextremum ($I_{\text{End}}/I_{\text{min}}$) am Ende des 80 ms-Testpulses in Abhängigkeit von der Membranspannung von Na_V -Kanälen und Kanalchimären untersucht mit Patch-Clamp in ND7/23-Zellen. Die Zahlen repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes von n unabhängigen Experimenten.

| Membranspannung (mV) | 9999_C4_L811P | n= | 9999_L811P | n= |
|-------------------------|-------------------|----|-------------------|----|
| -110 | 0.498 \pm 0.260 | 7 | 0.593 \pm 0.114 | 10 |
| -100 | 0.807 \pm 0.022 | 7 | 0.759 \pm 0.107 | 10 |
| -90 | 0.729 \pm 0.029 | 7 | 0.834 \pm 0.062 | 10 |
| -80 | 0.597 \pm 0.050 | 7 | 0.958 \pm 0.023 | 10 |
| -70 | 0.471 \pm 0.050 | 7 | 1.010 \pm 0.020 | 10 |
| -60 | 0.358 \pm 0.042 | 7 | 0.974 \pm 0.013 | 10 |
| -50 | 0.290 \pm 0.036 | 7 | 0.896 \pm 0.014 | 10 |
| -40 | 0.225 \pm 0.033 | 7 | 0.775 \pm 0.015 | 10 |
| -30 | 0.190 \pm 0.033 | 7 | 0.629 \pm 0.025 | 10 |
| -20 | 0.151 \pm 0.029 | 7 | 0.513 \pm 0.023 | 10 |
| -10 | 0.092 \pm 0.033 | 6 | 0.429 \pm 0.033 | 10 |
| 0 | | | 0.350 \pm 0.039 | 10 |

Tabelle 7.14: Übersicht der Zeitkonstante der schnellen Inaktivierung τ_h in Abhängigkeit von der Membranspannung von Na_V -Kanälen und Kanalchimären untersucht mit Patch-Clamp in ND7/23-Zellen. Die Zahlen repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes von n unabhängigen Experimenten.

| Membran- spannung (mV) | 9999_C4 (ms) | n= | 4444_YS (ms) | n= | 4444_C9_YS (ms) | n= | 9999 (ms) | n= |
|------------------------------|-----------------|----|-----------------|----|--------------------|----|-----------------|----|
| -80 | 17.5 \pm 1.3 | 2 | | | | | | |
| -70 | 12.8 \pm 1.0 | 8 | | | | | | |
| -60 | 10.4 \pm 1.1 | 10 | | | | | | |
| -50 | 8.6 \pm 0.8 | 9 | | | | | | |
| -40 | 9.7 \pm 1.5 | 5 | 3.6 \pm 1.05 | 5 | | | 47.1 \pm 26.6 | 6 |
| -30 | 8.9 \pm 1.4 | 3 | 1.4 \pm 0.29 | 6 | | | 43.5 \pm 8.0 | 14 |
| -20 | 7.6 \pm 1.3 | 3 | 0.5 \pm 0.05 | 7 | 7.0 \pm 1.40 | 8 | 24.1 \pm 2.8 | 14 |
| -10 | | | 0.3 \pm 0.02 | 7 | 2.1 \pm 0.43 | 8 | 16.6 \pm 2.0 | 14 |
| 0 | | | 0.3 \pm 0.01 | 7 | 0.8 \pm 0.13 | 8 | 13.1 \pm 1.8 | 14 |
| 10 | | | | | 0.5 \pm 0.06 | 8 | 9.9 \pm 1.7 | 11 |
| 20 | | | | | 0.4 \pm 0.04 | 8 | 8.5 \pm 1.5 | 11 |

Tabelle 7.15: Übersicht der Zeitkonstante der Deaktivierung τ_{deact} in Abhängigkeit von der Deaktivierungsspannung V_d von 9999, 9999_L811P und 9999_IQM untersucht mit Patch-Clamp in ND7/23-Zellen sowie 9999_IFC in Anwesenheit von 200 textmu M Lucifer Yellow vor und nach Bestrahlung (*) mit Blaulicht (450-490 nm). Die Zahlen repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes von n unabhängigen Experimenten.

| V_d (mV) | 9999 (ms) | n= | 9999_IFC (ms) | n= | 9999_IFC* (ms) | n= | 9999_LP (ms) | n= | 9999_IQM (ms) | n= |
|---------------|-----------------|----|------------------|----|-------------------|----|-----------------|----|------------------|----|
| -120 | 0.69 \pm 0.07 | 11 | 0.75 \pm 0.11 | 5 | 0.69 \pm 0.03 | 4 | 1.40 \pm 0.21 | 11 | 0.58 \pm 0.03 | 3 |
| -115 | 0.74 \pm 0.09 | 11 | 0.82 \pm 0.12 | 5 | 0.83 \pm 0.07 | 4 | 1.72 \pm 0.25 | 11 | 0.53 \pm 0.07 | 3 |
| -110 | 0.85 \pm 0.10 | 11 | 0.84 \pm 0.05 | 5 | 0.87 \pm 0.05 | 4 | 2.29 \pm 0.37 | 11 | 0.64 \pm 0.04 | 3 |
| -105 | 1.01 \pm 0.12 | 11 | 1.13 \pm 0.24 | 5 | 0.96 \pm 0.10 | 4 | 2.93 \pm 0.58 | 11 | 0.74 \pm 0.07 | 3 |
| -100 | 1.14 \pm 0.17 | 11 | 1.07 \pm 0.19 | 5 | 1.16 \pm 0.15 | 4 | 3.60 \pm 0.62 | 11 | 0.73 \pm 0.07 | 3 |
| -95 | 1.27 \pm 0.18 | 11 | 1.14 \pm 0.10 | 5 | 1.17 \pm 0.10 | 4 | 4.68 \pm 0.93 | 11 | 0.83 \pm 0.11 | 3 |
| -90 | 1.73 \pm 0.29 | 11 | 1.38 0.12 | 5 | 1.50 \pm 0.19 | 4 | 5.83 \pm 1.04 | 11 | 0.96 \pm 0.11 | 3 |
| -85 | 1.83 \pm 0.32 | 11 | 1.55 0.14 | 5 | 1.83 \pm 0.28 | 4 | 6.99 \pm 0.96 | 11 | 1.14 \pm 0.17 | 3 |
| -80 | 2.20 \pm 0.39 | 11 | 1.92 0.14 | 5 | 2.06 \pm 0.35 | 4 | 7.06 \pm 0.97 | 11 | 1.15 \pm 0.15 | 3 |
| -75 | 2.74 \pm 0.60 | 11 | 2.32 0.15 | 5 | 2.39 \pm 0.34 | 4 | 13.33 \pm 3.5 | 11 | 1.62 \pm 0.18 | 3 |
| -70 | 2.84 \pm 0.53 | 10 | 3.12 0.48 | 5 | 2.63 \pm 0.56 | 4 | 22.7 \pm 11.5 | 9 | 1.80 \pm 0.22 | 3 |
| -65 | 6.79 \pm 3.79 | 10 | 3.44 0.22 | 5 | 3.51 \pm 0.77 | 4 | | | 2.04 \pm 0.28 | 3 |
| -60 | | | 3.78 \pm 0.36 | 5 | 3.57 \pm 1.08 | 4 | | | 2.72 \pm 0.44 | 3 |
| -55 | | | 5.04 \pm 0.35 | 5 | 4.14 \pm 0.75 | 4 | | | 3.16 \pm 0.65 | 3 |
| -50 | | | 8.36 \pm 0.72 | 5 | 6.50 \pm 1.58 | 4 | | | 3.87 \pm 0.94 | 3 |

Tabelle 7.16: Übersicht der Zeitkonstante der Deaktivierung τ_{deact} in Abhängigkeit von der Deaktivierungsspannung V_d von 9999_C4 und 9999_C4_L811P untersucht mit Patch-Clamp in ND7/23-Zellen sowie 9999_IFC in Anwesenheit von 200 textmu M Lucifer Yellow vor und nach Bestrahlung (*) mit Blaulicht (450-490 nm). Die Zahlen repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes von n unabhängigen Experimenten.

| V_d (mV) | 9999_C4 (ms) | n= | 9999_C4_IFC* (ms) | n= | 9999_C4_LP (ms) | n= |
|---------------|-----------------|----|----------------------|----|--------------------|----|
| -120 | 0.52 \pm 0.05 | 5 | 0.80 \pm 0.14 | 7 | 1.41 \pm 0.06 | 6 |
| -115 | 0.57 \pm 0.05 | 5 | 0.82 \pm 0.11 | 7 | 1.58 \pm 0.11 | 6 |
| -110 | 0.64 \pm 0.07 | 5 | 0.84 \pm 0.10 | 7 | 1.93 \pm 0.15 | 6 |
| -105 | 0.70 \pm 0.06 | 5 | 0.91 \pm 0.12 | 7 | 2.29 \pm 0.16 | 6 |
| -100 | 0.80 \pm 0.10 | 5 | 1.03 \pm 0.12 | 7 | 2.80 \pm 0.24 | 6 |
| -95 | 0.87 \pm 0.09 | 5 | 1.19 \pm 0.16 | 7 | 3.50 \pm 0.31 | 6 |
| -90 | 1.13 \pm 0.18 | 5 | 1.39 \pm 0.19 | 7 | 4.51 \pm 0.60 | 6 |
| -85 | 1.18 \pm 0.13 | 5 | 1.59 \pm 0.20 | 7 | 6.39 \pm 0.95 | 6 |
| -80 | 1.48 \pm 0.18 | 5 | 1.98 \pm 0.27 | 7 | 8.13 \pm 1.24 | 6 |
| -75 | 1.79 \pm 0.26 | 5 | 2.37 \pm 0.37 | 7 | 9.98 \pm 1.77 | 6 |
| -70 | 2.15 \pm 0.40 | 5 | 3.16 \pm 0.51 | 7 | 13.23 \pm 2.65 | 6 |
| -65 | 2.98 \pm 0.41 | 5 | 4.03 \pm 0.76 | 7 | 18.64 \pm 4.27 | 6 |
| -60 | 4.31 \pm 0.72 | 5 | 4.91 \pm 1.05 | 7 | 21.12 \pm 3.48 | 6 |
| -55 | 5.52 \pm 0.93 | 5 | 5.67 \pm 1.58 | 7 | 23.29 \pm 3.39 | 6 |
| -50 | 6.39 \pm 0.83 | 5 | 7.22 \pm 3.53 | 7 | 23.16 \pm 2.19 | 6 |

Tabelle 7.17: Übersicht der Zeitkonstante der Deaktivierung τ_{deact} in Abhängigkeit von der Deaktivierungsspannung V_d von 9999_C4_L811P_IFC untersucht mit Patch-Clamp in ND7/23-Zellen in Anwesenheit von 200 textmu M Lucifer Yellow vor und nach Bestrahlung (*) mit Blaulicht (450-490 nm). Die Zahlen repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes von n unabhängigen Experimenten.

| V_d (mV) | 9999_C4_LP_IFC (ms) | n= | 9999_C4_LP_IFC* (ms) | n= |
|---------------|------------------------|----|-------------------------|----|
| -120 | 1.54 \pm 0.22 | 6 | 1.84 \pm 0.24 | 5 |
| -115 | 1.77 \pm 0.28 | 6 | 2.08 \pm 0.27 | 5 |
| -110 | 2.14 \pm 0.36 | 6 | 2.53 \pm 0.41 | 5 |
| -105 | 2.58 \pm 0.46 | 6 | 3.01 \pm 0.46 | 5 |
| -100 | 3.15 \pm 0.60 | 6 | 3.76 \pm 0.58 | 5 |
| -95 | 3.72 \pm 0.66 | 6 | 4.48 \pm 0.66 | 5 |
| -90 | 4.74 \pm 0.83 | 6 | 5.63 \pm 0.74 | 5 |
| -85 | 5.94 \pm 1.25 | 6 | 7.34 \pm 1.17 | 5 |
| -80 | 7.30 \pm 1.21 | 6 | 8.54 \pm 1.06 | 5 |
| -75 | 9.43 \pm 1.59 | 6 | 11.25 \pm 1.77 | 5 |
| -70 | 12.16 \pm 1.60 | 6 | 14.07 \pm 1.79 | 5 |
| -65 | 16.14 \pm 1.79 | 6 | 20.12 \pm 1.08 | 5 |
| -60 | 20.92 \pm 2.71 | 6 | 27.00 \pm 2.78 | 5 |
| -55 | 26.80 \pm 2.90 | 6 | 37.70 \pm 3.50 | 5 |
| -50 | 31.55 \pm 4.28 | 6 | 39.93 \pm 3.68 | 5 |

Tabelle 7.18: Übersicht der Parameter von Kanalaktivierung V_m , k_m und Kanalinaktivierung V_h und K_h in Abhängigkeit von der intrazellulären F^- -Konzentration von 9999_C4 sowie 4444_YS in HEK293T-Zellen untersucht mit Patch-Clamp. Die Zahlen repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes von n unabhängigen Experimenten. Die entsprechenden Lösungen sind in Abschnitt 2.3.4 nachzulesen; "0*" repräsentiert die F^- - sowie Ca^{2+} -freie Standardpipettenlösung 2.

| 9999_C4 [F^-] | V_m (mV) | k_m (mV) | | V_h (mV) | k_h (mV) | |
|----------------------|-----------------|----------------|---|------------------|----------------|---|
| 105 | -73.5 \pm 3.5 | 11.8 \pm 0.7 | 6 | -108.6 \pm 3.2 | 10.1 \pm 0.8 | 6 |
| 30 | -53.2 \pm 1.6 | 14.1 \pm 0.9 | 4 | -95.0 \pm 2.1 | 8.3 \pm 0.3 | 4 |
| 0 | -39.1 \pm 2.6 | 17.3 \pm 2.3 | 6 | -93.9 \pm 1.1 | 8.2 \pm 1.0 | 3 |
| 4444_YS | | | | | | |
| 105 | -50.3 \pm 1.8 | 6.7 \pm 0.5 | 5 | -81.8 \pm 2.2 | 5.3 \pm 0.1 | 5 |
| 30 | -36.4 \pm 1.3 | 7.3 \pm 0.5 | 4 | -68.5 \pm 0.2 | 5.6 \pm 0.2 | 4 |
| 0* | -34.2 \pm 1.2 | 8.8 \pm 0.5 | 6 | -69.0 \pm 0.9 | 5.4 \pm 0.1 | 6 |
| 0 | -33.2 \pm 1.9 | 9.5 \pm 0.4 | 8 | -67.4 \pm 2.8 | 6.1 \pm 0.3 | 7 |

Publikationstätigkeit

Publikation Leipold E, Liebmann L, Korenke GC, Heinrich T, Giesselmann S, Baets J, Ebbinghaus M, **Goral RO**, Stöddberg T, Hennings JC, Bergmann M, Altmüller J, Thiele H, Wetzel A, Nürnberg P, Timmerman V, De Jonghe P, Blum R, Schaible HG, Weis J, Heinemann SH, Hübner CA, Kurth I: **A *de novo* gain-of-function mutation in SCN11A causes loss of pain perception.** *Nature Genetics* 45(11):1399–1404, 2013.

Poster Leipold E, **Goral RO**, Heinemann SH, Hübner CA, Kurth I: **Increased activity of Nav1.9 sodium channels causes loss of pain perception.** 58th Meeting of the Biophysical Society, 2014.

Danksagung

Das Verfassen dieser Arbeit hat viel Zeit in Anspruch genommen und wurde von vielen Helfern unterstützt. Ich möchte besonders meinem Doktorvater Herrn Prof. Heinemann für das entgegengebrachte Vertrauen danken, da er mir die Möglichkeit gab, als Doktorand in seinem Labor zu arbeiten. Er hat meine Arbeit finanziert, mir Anregungen bei den Experimenten gegeben, bei der Datenauswertung geholfen und unzählige Fragen beantwortet. Ich bin sehr dankbar dafür, mit Dr. Enrico Leipold zusammengearbeitet zu haben. Er hat mir sehr viel davon beigebracht, was ich für die experimentelle Arbeit im Labor brauchte. Von PD Dr. Roland Schönherr habe ich viele interessante Denkanstöße in Gesprächen und Diskussionen erhalten.

Meine Arbeit wurde durch die tatkräftige, technische Assistenz von Angela Rossner, Holger Sack, Anja Kessler und Gudrun Steinmetzer erst möglich, denen ich an dieser Stelle danken möchte. Voller Dankbarkeit bin ich für das kritische Lesen des Manuskripts durch Martin Schink, Maria Hinzmann, Katharina Wolf, Sören Steingräber sowie Patrick Marcinkowski. Außerdem danke ich meinen Eltern für ihren Zuspruch, ihr Vertrauen und ihre Unterstützung in vielen Situationen.

8 Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst verfasst wurde. Für die Erstellung habe ich keine Textabschnitte von Dritten oder aus eigenen Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen. Es wurden alle benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angegeben, welche Grundlagen dieser Arbeit sind.

Jena, den

.....

Oliver Goral